

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

SANDRA LUISA TOILLIER

**CONTROLE DE CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) E ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS EM FEIJOEIRO INDUZIDAS POR *Pycnoporus
sanguineus***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
AGOSTO/2008

SANDRA LUISA TOILLIER

**CONTROLE DE CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) E ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS EM FEIJOEIRO INDUZIDAS POR *Pycnopus
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
AGOSTO/2008

*Aos meus pais, Tarcísio Luiz e Ires
Maria Toillier, e às minhas irmãs, Carla
e Fernanda,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela companhia e pela força;

Aos meus pais e minhas irmãs, por acreditarem em mim, além de todo o apoio que sempre me deram;

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, pela orientação e pela paciência, pelos ensinamentos e conselhos, que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional, além da conclusão deste trabalho;

Ao prof. Dr. Odair José Kuhn (co-orientador), por sua amizade e por suas importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho;

A UNIOESTE – *Campus* de Marechal Cândido Rondon, pelo programa de Pós-graduação, por disponibilizar a estrutura, o laboratório e todo o material necessário para a conclusão da pesquisa;

Aos amigos do laboratório da UNIOESTE: Gilmar, Clair, Luciana, Mauricele, Cris, Érica, Viviane, Wiviany, Simone, pela amizade, companhia e apoio, cada um, em determinadas fases do experimento;

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos;

As amigas, Anelisa (Aninha) Fabiane (Fabi) e Renata (Rê), da UNIOESTE – Extensão de Santa Helena, por terem contribuído ao estágio remunerado, o qual proporcionou financeiramente, a continuidade da minha caminhada, além do apoio psicológico que sempre me deram;

Aos colegas de trabalho que tive durante o estágio, Janete, Lucimara, Luci, Lucélia, Bianchecci, Gumercindo (Guma), João, Karina, por dividir comigo muitos momentos. E aos novos colegas de trabalho, Dilson, Tânia, Joéslei, André, Almir e Jeferson, pelo exemplo de profissionalismo e amizade;

À família Kumm, que me acompanha nesta caminhada e sempre me incentivou e me apoiou;

Meu carinho em especial, a amiga Ana Beatriz Cöttica, parceira de todos os momentos; à amiga Tatiani Chapla, que mesmo virtualmente, foi essencial em muitos momentos da elaboração do trabalho e ao amigo Lindomar Elsinga (Max), pelos consertos no computador, quando precisei e por sempre estar disposto a ajudar;

A amiga Eliane Márcia Tormes e ao Antonio Benítez Cariño, pelo apoio e carinho que me deram nos momentos mais críticos e por sempre acreditarem em mim;

E por fim, expressar reconhecimento a todas as pessoas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	11
2.1.1 Crestamento bacteriano comum (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>).....	13
2.1.2 Sintomas.....	13
2.1.3 Etiologia e sintomatologia	14
2.1.4 Controle do crestamento bacteriano comum.....	14
2.2 CONTROLE DE DOENÇAS.....	15
2.2.1 Controle alternativo de doenças.....	16
2.2.1.1 Indução de resistência.....	16
2.2.1.1.1 Alterações fisiológicas da indução de resistência	17
2.2.1.1.1.1 Proteínas	17
2.2.1.1.1.2 Alterações bioquímicas da indução de resistência	17
2.2.1.1.1.2.1 Peroxidase	17
2.2.1.1.1.2 Polifenoloxidase	18
2.2.1.1.1.3 Fenilalanina amônia-liase.....	19
2.2.1.1.1.4 β -1,3 glucanase.....	20
2.2.1.2 Indutores de resistência	20
2.2.2 Potencial de cogumelos no controle de doenças.....	22
2.2.2.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L. ex Fr.).....	22
2.2.2.2 Potencial de <i>P.sanguineus</i> no controle de doenças.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DO DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS.....	25
3.2 ISOLAMENTO DA BACTÉRIA.....	26
3.3 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	26
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	27
3.4.1 Obtenção de extrato bruto aquoso de <i>P. sanguineus</i>	27
3.4.2 Micélio de <i>P. sanguineus</i> obtido do cultivo em meio líquido.....	28
3.4.3 Extrato do filtrado da cultura de <i>P. sanguineus</i>	28

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	28
3.6 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	29
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	30
3.7.1 Coleta de amostras para análise bioquímica.....	30
3.7.2 Obtenção dos extratos protéicos	30
3.7.3 Teor de proteína	30
3.7.4 Determinação da atividade de peroxidase	31
3.7.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase	31
3.7.6 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase.....	32
3.7.7 Determinação da atividade de β -1,3 glucanase.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33
4.2 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE	36
4.3 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	38
4.3.1 Teor de proteína	38
4.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	40
4.4.1 Atividade de peroxidase	40
4.4.2 Atividade de polifenoloxidase	42
4.4.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	44
4.4.3 Atividade de β -1,3 glucanase	46
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) está entre uma das principais da agricultura nacional e pode ser afetada por várias doenças, como o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. O entendimento desse patossistema pode contribuir para que sejam desenvolvidos métodos alternativos para o controle desta doença. O objetivo deste trabalho foi verificar as atividades antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *Pycnoporus sanguineus* para controle desta doença em feijoeiro. O estudo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR e foram utilizados extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20%, além das testemunhas, água, acibenzolar-S-metil (ASM - 125 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). Para o teste *in vivo*, foi realizada a avaliação de severidade e atividade de peroxidase, polifenoloxidase, β-1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase, com o uso de extrato de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus* a 5 e 10%, sendo estes ensaios conduzidos em estufa na área pertencente ao Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Mário César Lopes da UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon. *In vitro* verificou-se atividade antibacteriana apenas para o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo em todas as concentrações avaliadas. *In vivo*, os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência envolvendo a ativação das enzimas de defesa vegetal estudadas.

Palavras-chave: controle alternativo, indução de resistência, proteínas relacionadas à patogênese, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Control of bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) and biochemical analyses of bean resistance treated with *Pycnoporus sanguineus* extracts

Bean (*Phaseolus vulgaris*) is among one of the main Brazilian crops and can be affected by several diseases, such as common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. The study of this interaction can contribute to development of alternative methods to control this disease. The aim of this work was to verify the antimicrobial and resistance induction activities of *Pycnoporus sanguineus* extracts for the control of this bean disease. The *in vitro* assays was conducted at the Laboratory of Plant of the State University of West of Paraná (UNIOESTE) - Campus of Marechal Cândido Rondon - PR and were used aqueous extracts from basidiocarp, mycelium and culture filtrate of *P. sanguineus* in concentrations of 1, 5, 10, 15 and 20%, with water, acibenzolar-S-methyl (ASM - 125 mg a.i. L⁻¹) and antibiotic (oxytetracycline 22.5 mg L⁻¹ + streptomycin 225 mg L⁻¹) as control treatments. For *in vivo* assays were evaluated disease severity and the activities of peroxidase, polyphenol oxidase, β -1,3 glucanase and phenylalanine ammonia-lyase, using extracts of mycelium, basidiocarp and culture filtrate of *P. sanguineus* at 5 and 10%, these tests being conducted in greenhouses in the area belonging to the Complex Biological Control and Protected Cultivation Mario Cesar Lopes of UNIOESTE, Campus of Marechal Cândido Rondon. *In vitro* was verified antibacterial activity only for culture filtrate in concentrations up 15% and for all concentrations of basidiocarp extract. *In vivo* the results indicated the potential of basidiocarps extracts from *P. sanguineus* for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean, which can occur either by direct antimicrobial activity and resistance induction involving the activation of enzymes studied.

Key words: alternative control, resistance induction, pathogenesis related proteins, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Fonte: TOILLIER, S. L.....27
- Figura 2 Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de micélio de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-s-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%..... 33
- Figura 3 Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de filtrado de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-s-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.....34
- Figura 4 Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* e sua comparação com efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-s-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.....34
- Figura 5 Severidade para crescimento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseolus* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de basidiocarpo (B) e de micélio (M) e filtrado de cultura (F) de *P. sanguineus* em concentrações de 5 e 10%, na primeira folha tratada e inoculada (**A**) e na segunda folha (**B**) apenas inoculada, em condições de casa de vegetação. Agr: antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina); ASM: acibenzolar-s-metil (125 mg i.a. L⁻¹); Água: testemunha. Médias seguidas de mesma letra (a/b), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%..37
- Figura 6 Teor de proteína em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada

- inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.....39
- Figura 7 Atividade específica de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão41
- Figura 8 Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼)(a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.....43
- Figura 9 Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼)(a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.....45
- Figura10 Atividade específica de β-1,3-glucanase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼)(a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.....47

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre uma das principais da agricultura nacional e pode ser afetada por várias doenças, como o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vanterin, Hoste, Kersters e Swinger (Xap). A maioria dos cultivares de feijoeiro em uso nas diferentes regiões do país é suscetível a esta bactéria e a eficácia do controle químico com bactericidas é contraditória.

Atualmente busca-se a produção de alimentos orgânicos, ou seja, isenta da utilização de produtos químicos. Nesse cenário, encontramos o controle alternativo de doenças, que envolve o controle biológico (uso de microrganismos antagônicos), a indução de resistência (ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas) e o uso de produtos naturais com atividades antimicrobiana direta e/ou indutora de resistência. Entre esses produtos naturais, estão os óleos essenciais, extratos de plantas medicinais e de cogumelos.

Com relação aos cogumelos, têm-se o controle de mancha marrom e ferrugem em trigo e de antracnose em pepino com extratos dos basidiomicetos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol). Trabalhos preliminares têm indicado o potencial de extratos aquosos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* (fungo saprófita, decompositor de madeira e com propriedades medicinais) para o controle da antracnose causada por *Colletotrichum 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.

Dessa forma, o melhor entendimento da interação feijoeiro – *P. sanguineus* - *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, pode contribuir para que sejam desenvolvidos métodos alternativos ao químico para o controle desta doença. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos estudar possíveis mecanismos de defesa do feijoeiro a este patógeno, como o envolvimento de proteínas relacionadas à patogênese, quando tratado com extratos de basidiocarpo, micélio ou filtrado de cultura de *P. sanguineus*, o que poderá auxiliar na condução de pesquisas futuras para se obter um controle mais adequado ou eficiente desta doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro pertence ao gênero *Phaseolus*, que inclui aproximadamente 100 espécies, sendo cultivadas apenas quatro: *P. vulgaris* L. (feijão comum), *P. coccineus* L. (feijão ayocote), *P. acutifolius* F. (feijão tepari) e *P. lunatus* L. (feijão de lima). O feijoeiro comum é a principal espécie deste gênero. É uma planta anual herbácea e termófila, isto é, não suporta geada, sendo que seu cultivo visa principalmente a produção de grãos (VIEIRA & HEMP, 1992), o qual constitui um dos alimentos básicos da população brasileira e um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar bem como, rico em ferro (VIEIRA et al., 2006).

Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México. Mas a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos. Mesmo o aumento de 48% na produtividade, verificado neste período, ainda resultou numa diminuição de 4% na produção, portanto, não sendo suficiente para atender a demanda (YOKOYAMA, 2003).

A área ocupada pelo feijoeiro anualmente no Brasil está em torno de 4 milhões de hectares, produzindo mais de três milhões de toneladas, considerando as três épocas de produção (águas, seca e inverno com irrigação), sendo cultivado tanto por pequenos agricultores que utilizam baixo nível tecnológico no processo produtivo, quanto por empresários rurais altamente tecnificados (IBGE, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão-comum e também o maior consumidor dessa leguminosa, com um consumo per capita em 2003, de cerca de 16 kg/ano (VIEIRA et al., 2006). É produzido em praticamente toda a área nacional, com destaque para Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Ceará, Pernambuco e Pará, sendo que os cinco primeiros são responsáveis por praticamente 65% da produção nacional. A região Sul contribuiu no ano de 2004, com 32% da produção nacional, representando mais de 953 mil toneladas. O Estado do Paraná foi responsável por 22% da produção brasileira de feijão em 2004, com mais de 668 mil toneladas, onde se destacam: Curitiba, Ponta

Grossa, Irati, Guarapuava, União da Vitória, Jacarezinho, Cascavel, Pato Branco e Umuarama (FNP, 2005).

O Paraná consegue colher parte da safra das águas a partir de outubro, sendo que a maior concentração ocorre em dezembro e janeiro. Nos outros meses do ano, o índice de colheita em relação ao restante do país é menos significativo, com exceção de março e abril (com vantagem da colheita ser contínua). Colhe-se uma terceira safra no noroeste paranaense, sendo assim, pode-se verificar que este Estado sempre oferta feijão novo e é o que mais contribui para o abastecimento nacional. Na colheita da primeira safra, cerca de 50% do feijão produzido é do tipo preto, enquanto na 2ª e 3ª safras o destaque é para o feijão de cores (FERREIRA et al., 2002).

No ano de 2007, a produção nacional total de feijão em grãos 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). As condições climáticas e problemas fitossanitários da cultura podem ser responsáveis pela queda da produção agrícola de feijão no Brasil (BORÉM & CARNEIRO, 2006).

O feijoeiro é afetado por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, 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 destas doenças podem causar, de acordo com as condições do ambiente, danos totais na produção ou, dependendo do nível de contaminação, tornar inviáveis determinadas áreas para o cultivo (PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 1998).

Desde a sementeira até quando os grãos estão secos nas vagens ou armazenados, podem-se observar danos causados pelas pragas e doenças na cultura do feijoeiro (EMBRAPA, 2004), as quais constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil (VIEIRA et al., 2006). Como é uma planta que apresenta ciclo curto, pode ser cultivado duas a três vezes no mesmo ano agrícola, ficando sujeito a diversos fatores que interferem na sua produção, além de depreciar a qualidade do produto (EMBRAPA, 2004), dentre os quais está o crestamento bacteriano comum.

2.1.1 Crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*)

O crestamento bacteriano comum é uma doença cosmopolita que ocorre na cultura do feijoeiro, principalmente nas regiões úmidas e quentes do globo, ocorrendo no Brasil também nessas regiões. Tem sido problemática na Região Sudeste, Sul e Centro-oeste, principalmente na safra das águas. Não existem estimativas de danos que esta doença acarreta na produção sob as condições brasileiras. Trabalhos desenvolvidos no exterior mostraram que podem variar de 0,2 a 45% (BIANCHINI et al., 2005).

2.1.2 Sintomas

Os sintomas típicos da doença são visíveis em toda parte aérea da planta. Nas folhas, as lesões inicialmente são visíveis na face inferior, onde são pequenas e encharcadas e à medida que se desenvolvem, os tecidos tornam-se secos e quebradiços, circundados por um halo amarelo facilmente observado na face superior das folhas. As lesões nos caules das plantas novas são deprimidas e iniciam-se sob a forma de manchas aquosas, que aumentam gradualmente de tamanho e tomam a aparência de riscos vermelhos que se estendem ao longo do caule, cuja superfície normalmente racha, podendo o exsudato bacteriano acumular-se na lesão. Nas vagens, as lesões inicialmente são encharcadas, circulares a irregulares, apresentando ou não exsudato bacteriano de cor amarela para depois se tornarem secas e avermelhadas, sendo a infecção normalmente observada na sutura das vagens. As sementes infectadas podem se apresentar descoloridas, enrugadas ou simplesmente não apresentar sintomas visíveis (OLIVEIRA & SOUZA, 1997).

O principal modo de disseminação da bactéria de uma área para a outra se faz através de sementes contaminadas, e dentro de uma plantação, através de respingos de chuva, implementos agrícolas e insetos. As plantas originárias de sementes infectadas podem desenvolver lesões que circundam o nó cotiledonar, provocando o seu enfraquecimento e a quebra do caule, o qual não suporta o peso das vagens (ROSOLEM et al., 1994).

2.1.3 Etiologia e epidemiologia

O agente causal do crestamento bacteriano comum do feijoeiro é atualmente denominado *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Esta bactéria, quando cultivada em meio nutriente-ágar contendo glicose ou sacarose, forma colônias amareladas de bordos lisos, convexas, brilhantes e circulares. A bactéria é baciliforme, gram-negativa, possui um flagelo polar e cresce a 37 °C (BIANCHINI et al., 2005).

X. axonopodis pv. *phaseoli* sobrevive de diferentes formas. Em sementes, pode sobreviver por períodos variáveis de dois a 15 anos, no estado hipobiótico (latente), podendo estar localizada interna ou externamente à semente, sem perder sua patogenicidade. Algumas ervas-daninhas são hospedeiras da bactéria como *Acalypha aloperoides*, *Ambrosia artemisifolia*, *Amaranthus* spp., *A. retroflexus*, *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus*, *Physalis* sp., *Portulaca oleraceae*, *Sida rhombifolia*, *Ruellia tuberosa*, *Strophostyles helvola*, *Vicia sativa* e *V. villosa* (RAVA & SARTORATO, 1994).

2.1.4 Controle do crestamento bacteriano comum

Devido à sua ampla distribuição, à capacidade de reduzir a produção de forma significativa e às dificuldades de controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (TEBALDI et al., 2007), este é realizado através da adoção de várias medidas simultaneamente, onde o emprego de sementes de boa qualidade sanitária é primordial (BIANCHINI et al., 2005).

Alguns países como Estados Unidos, Canadá, França e Holanda, têm como rotina, o exame sanitário de sementes de feijoeiro, visando a certificação para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e outros patógenos de importância econômica para a cultura. Embora existam várias técnicas de detecção para este patógeno, no Brasil não há o emprego rotineiro da análise de sementes de feijoeiro, para certificação das sementes para esta bactéria. Além de que a produção de sementes deve ser realizada sob condições climáticas desfavoráveis à doença (BIANCHINI et al., 2005).

Outro problema sério são as lavouras de subsistência, onde pouca ou nenhuma tecnologia é empregada, utilizando sementes próprias, o que facilita a perpetuação do patógeno de um cultivo para outro. Algumas medidas que também

podem ser adotadas são: incorporação de restos culturais infectados a uma profundidade de 15-20 cm, rotação de cultura com plantas não hospedeiras da bactéria por um período mínimo de um ano, eliminação de ervas daninhas e voluntárias, além do controle de insetos disseminadores desta bactéria. Infelizmente, a maioria dos cultivares de feijoeiro em uso nas diferentes regiões do país é suscetível a essa bacteriose (OLIVEIRA & SOUZA, 1997). Têm-se disponíveis algumas variedades com níveis moderados de resistência, tais como: Bambrei, BR IPAGRO 44, BRS MG Talismã, Diamante negro e Safira (BIANCHINI et al., 2005).

A eficácia do controle químico dessa doença, com a pulverização das plantas com produtos bactericidas, é muito contraditória. Pesquisas desenvolvidas no Brasil, mais especificamente no Estado do Paraná, evidenciaram a ineficácia de três pulverizações dos produtos oxiclreto de cobre, sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina, oxiclreto de cobre + maneb e oxiclreto de cobre + zineb no controle da doença nas folhas e vagens e na redução da transmissão da bactéria por sementes (BIANCHINI et al., 2005).

2.2 CONTROLE DE DOENÇAS

Na maior parte dos casos, o controle químico de doenças de plantas, é o único método eficiente e economicamente viável para garantir a alta produtividade e a qualidade da produção (KIMATI, 1995). Como conseqüência, o uso indiscriminado desses produtos, pode acarretar, em determinado tempo, o surgimento de isolados de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (GHINI & KIMATI, 2000), além do ressurgimento de pragas, contaminação de alimentos e do meio ambiente, intoxicação de homens e animais (BURG & MAYER, 1998).

Visando minimizar os impactos causados no ambiente e na saúde dos seres vivos, atualmente, buscam-se alternativas para o manejo adequado de pragas e doenças.

2.2.1 Controle alternativo de doenças

Na agricultura orgânica, o controle alternativo de pragas e doenças é aquele que inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas (MORAES, 1992) e o uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e/ou indutores de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

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

2.2.1.1 Indução de resistência

Segundo Moraes (1992), a expressão “indução de resistência” serve tanto para designar proteção local, ou seja, a indução de resistência apenas nos tecidos em que foi realizado o tratamento com agente indutor (onde se manifesta), ou sistêmica, quando manifesta-se longe do local onde foi aplicado o agente indutor. Segundo Lyon et al. (1995), a indução de resistência pode ser considerada como uma estratégia potencial para o controle fitossanitário.

A resistência induzida já foi verificada em diversas plantas, como monocotiledôneas e dicotiledôneas (SCHNEIDER et al., 1996). Esse tipo de proteção vai depender do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação do patógeno (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida.

A resistência induzida envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos, como microrganismos viáveis ou inativos, ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (HIJWEGWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (RESENDE et al., 2001), além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005a). Esses mecanismos de resistência podem incluir o acúmulo de compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas

relacionadas à patogênese (como β -1,3 glucanase, quitinase e peroxidase) (PASCHOLATI & LEITE, 1995; CAVALCANTI et al., 2005b).

2.2.1.1.1 Alterações fisiológicas da indução de resistência

2.2.1.1.1.1 Proteínas

Entre as proteínas, existem as relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), que são definidas como proteínas vegetais que são induzidas nos tecidos vegetais sistemicamente ou em parte destes, e acumulam-se após o ataque por um patógeno ou situações relacionadas, como o tratamento com certos agentes químicos e outros tipos de estresses (físicos) que simulam o efeito de patógenos (VAN LOON et al., 1994 *apud* GUZZO, 2003). A ativação da síntese protéica 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.

2.2.1.1.2 Alterações bioquímicas da indução de resistência

2.2.1.1.2.1 Peroxidase

As peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), pertencentes à 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).

A enzima peroxidase (E.C. 1.11.1.7) e suas isoformas participam de várias mudanças nos processos fisiológicos de plantas submetidas a estresses, catalisando a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico (remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos) na

presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina (polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanóides). 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 (GASPAR et al., 1982; GASPAR et al., 1985; PASCHOLATI & LEITE, 1994).

As peroxidases também oxidam compostos fenólicos, participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno em resposta ao ataque de patógenos, regulam o nível de ácido indolacético (AIA) e a dormência das sementes (LAGRIMINI et al., 1987; ABELES & BILES, 1991; ASADA, 1992; GUZZO, 2003).

2.2.1.1.2.2 Polifenoloxidase

As polifenoloxidases (E.C. 1.14.18.1), PPO, também conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases, são enzimas intracelulares que ocorrem em plantas, animais e fungos (WHITAKER, 1994; ZAWISTOWSKI, 1991). Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

As polifenoloxidases agrupam 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 mantêm-se inativas no interior da célula vegetal, compartimentalizadas 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).

2.2.1.1.2.3 Fenilalanina amônia-liase

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários chamados de compostos fenólicos, que agem como compostos de defesa contra patógenos, suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina (DIXON & PAIVA, 1995; WHETTEN & SEEDEROFF, 1995) e proteção contra radiação UV (DIXON & PAIVA, 1995). A classe mais abundante de compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido *trans*-cinâmico, esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (TAIZ & ZEIGER, 2006). O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres (CAVALCANTI et al., 2005b).

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) é a primeira enzima do metabolismo fenilpropanóide na maioria das plantas e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta à infecções (STRACK, 1997). É uma enzima largamente estudada por fisiologistas por causa de sua importância chave no metabolismo secundário das plantas, e em meio ao fenômeno da indução de resistência, também é uma das enzimas mais estudadas (KUHN, 2007). A FAL tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos (RÖSLER et al., 1997) e bactérias (XIANG & MOORE, 2005). A invasão de patógenos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica FAL, aumentando a quantidade desta enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2006).

A rota biossintética do AS apresenta seu início com a conversão da fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico (*t*-CA), sendo catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). O *t*-CA é convertido em AS, este produto do metabolismo de fenilpropanóides, pode ter papel fundamental na transmissão de sinais para ativar a SAR (SILVA, 2002; MORAES, 1998). Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com ácido salicílico (AS) e um isolado de *Colletotrichum lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade de fenilalanina amônia-liase, porém a magnitude desta atividade variou em função do cultivar.

Latunde-Dada & Lucas (2001) verificaram que em plantas de *Vigna unguiculata* inoculadas com *Colletotrichum destructivum*, o aumento da resistência em tecidos induzidos por ASM foi associado com um rápido e efetivo aumento nas atividades de duas enzimas-chave na via de fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase e chalcona isomerase) que levou a um acelerado acúmulo de substâncias do grupo dos flavonóides, kievitonas e faseolidina.

2.2.1.1.2.4 β -1,3 glucanases

As proteínas relacionadas à patogênese como as β -1,3 glucanases (E.C. 3.2.1.39) (STINTIZI et al., 1993) pertencem à família PR-2 e são agrupadas em pelo menos três classes distintas, com base nas seqüências de aminoácidos de suas estruturas primárias. As glucanases de classe I são proteínas básicas localizadas no vacúolo da célula vegetal, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas sadias, enquanto que as classes II e III incluem as proteínas ácidas extracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001 *apud* GUZZO, 2003).

As β -1,3 glucanases têm sido relatadas principalmente como inibidoras do crescimento fúngico (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999), pois hidrolisam polímeros de β -1,3 glucana, composto que juntamente com a quitina são os principais componentes da parede celular dos fungos (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

Na indução de resistência, o incremento da β -1,3 glucanase está relacionado com a defesa da planta. Kuhn (2007) verificou aumento significativo da enzima, quando as plantas de feijão foram tratadas 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*.

2.2.1.2 Indutores de resistência

A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a posterior atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Segundo Pascholati & Leite (1995), os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias, os pré-formados - presentes na planta antes do contato com o patógeno e os pós-formados - produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Ainda segundo esses autores, cada grupo de mecanismo compreende, por exemplo:

- Pré-formados (passivos; constitutivos):

- a) estruturais: cutículas, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;

- b) bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fitoalexinas.

- Pós-formados (ativos; induzíveis):

- a) estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses;

- b) bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese.

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas correlacionadas a mudanças na atividade de enzimas chaves, como a peroxidase e fenilalanina amônia-liase, nos metabolismos primário e secundário, assim como enzimas relacionadas diretamente na atividade de defesa, como as β -1,3 glucanases (CAVALCANTI et al., 2005b).

Os elicitores são moléculas de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar e/ou induzir qualquer resposta de defesa nas plantas (SMITH, 1996). Dentre os elicitores não convencionais, podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (compostos secundários) com propriedades antimicrobianas 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).

Apesar dos resultados promissores do ponto de vista de controle de fitopatógenos, tem-se que avaliar ainda se a aplicação destes produtos interfere no desenvolvimento vegetativo e no rendimento da cultura em condições de campo. Estudos têm demonstrado que a resposta aos elicitores envolve uma série de alterações metabólicas nas plantas, como a síntese de compostos secundários e para tal, a indução da resistência pode alterar a partição de carbono e o desenvolvimento vegetal (ANTONIAZZI, 2005). Segundo Herrmann & Weaver (1999), a rota do chiquimato, responsável pela formação de grande parte destes compostos, é considerada uma das vias principais de fluxo de carbono em plantas.

2.2.2 Potencial de cogumelos no controle de doenças de plantas

Segundo Fiori-Tutida et al. (2007), são escassos os trabalhos que têm utilizado cogumelos para o controle de doenças em plantas, mas os estudos realizados até o momento, têm apresentado resultados animadores, demonstrando a importância dos cogumelos no mercado mundial, levando-se em consideração o seu valor nutricional e as possíveis aplicações na área médica e industrial e, mais recentemente, na área agrícola, para o controle de doenças de plantas.

Di Piero & Pascholati (2004) demonstraram redução parcial na severidade da antracnose foliar em plantas de pepino pré-tratadas com os extratos de *L. edodes* e *A. blazei*, bem como sistematicamente. O efeito protetor foi dependente da concentração do extrato de cogumelo utilizado e, em menor grau, do intervalo de tempo entre indução-inoculação e das condições do ambiente.

Fiori-Tutida (2003) verificou através dos extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, potencial destes fungos como eliciadores de respostas de defesa em plântulas, pois estimularam a produção de fitoalexinas em soja e em sorgo, indução de proteínas relacionadas à patogênese - RP (glucanase e peroxidase) em trigo e rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de trigo.

2.2.2.1 *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.)

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

Esta espécie apresenta uma frutificação semicircular e encontra-se distribuída horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente

marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-alaranjada (LEPP, 2005) e apresenta a capacidade de produção de alfa-amilase (SIQUEIRA et al., 1997).

O fungo *P. sanguineus*, conhecido popularmente como orelha-de-pau, pertence ao filo Basidiomycota e a família Polyporaceae. Pelo seu hábito saprofítico, nutre-se de algumas espécies de madeiras nas florestas, sendo que evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies para o gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus* (Jacq. Ex Fr.) Karst., presente 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).

Tornou-se conhecido por suas características fitoterápicas, as quais são empregadas em tratamentos de reumatismo, artrite e gota. Quando moído e em infusão é usado contra disenteria, cistos subcutâneos, verrugas e para desinflamar os pés. Possui ainda atividade adstringente, antimicrobiana e antifúngica (FIDALGO, 1995). Ainda segundo esse autor, alguns indígenas brasileiros usavam *P. sanguineus* para estancar hemorragias. Segundo Perez-Silva et al. (1998), o fungo tem sido usado na medicina popular por tribos indígenas das Américas e da África para tratamento de diversas injúrias.

Os efeitos medicinais relatados pelo uso de *P. sanguineus* são devidos à síntese de uma variedade de metabólitos, como pigmentos vermelho-alaranjados característicos do tipo 2-amino fenoxazina e esteróis. Entre os diversos pigmentos isolados e identificados, a cinabarina, o ácido cinabarínico e a tramesanguina são os mais abundantes, enquanto que 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).

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 -glicosidase na cepa amazônica de *P. sanguineus*, indica-o para uso industrial, especialmente em tratamento de efluentes da indústria papelreira.

2.2.2.3 Potencial de *P. sanguineus* no controle de doenças

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

Smânia et al. (1995, 1998), estudaram um antibiótico produzido por *P. sanguineus*, mostrando que este basidiomiceto produziu cinabarina – pigmento de cor laranja ativo contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e vários *Streptococcus* spp.

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).

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

Beninca (2007) verificou que os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *P. 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 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DO DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

Para o experimento *in vitro* foi utilizado o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Paraná – UNIOESTE - *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), organizado em esquema fatorial $3 \times 5 + 3$ (três tipos de extratos: basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura, cinco concentrações: 1, 5, 10, 15 e 20% e três controles: ASM, antibiótico e água) com quatro repetições. Foram utilizados os programas estatísticos Sigma Plot 2000 (construção dos gráficos) e Sisvar para a análise estatística destes dados.

Os ensaios para a indução de resistência foram conduzidos em estufa na área pertencente ao Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Mário César Lopes da UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon. As plantas de feijoeiro cultivar Carioca IAPAR 81 foram cultivadas em vasos plásticos (com capacidade para 1,5 L) contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1) e mantidas em cultivo protegido (ASSI, 2005). Foram utilizadas duas plantas por vaso. Para a avaliação de severidade foi utilizado o programa estatístico STAT.

As análises bioquímicas foram organizadas em esquema fatorial $3 \times 2 + 3$ (três tipos de extratos: basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura; duas concentrações: 5 e 10%; e três controles: água, antibiótico e ASM). Cada tratamento apresentava três repetições, sendo que cada repetição foi representada por três quadrados de tecido vegetal. Foi utilizado o programa estatístico Sigma Plot 2000 (construção dos gráficos) e Sisvar para a análise estatística destes dados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados por teste de médias ou equações de regressão, conforme a pertinência.

3.2 ISOLAMENTO DA BACTÉRIA

Foram coletadas folhas de feijoeiro que apresentavam lesões características provocadas pela bactéria *X. axonopodis* pv *phaseoli*, provenientes de cultivos comerciais do município de Marechal Cândido Rondon - PR.

O isolamento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Mariano & Silveira (2000). Para tanto, foram cortados fragmentos da folha (0,5 cm) na área de transição tecido sadio e tecido doente, o qual foi imerso em álcool 50% por 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio (três partes de água para uma parte de hipoclorito) por 1 min e, por fim, em água destilada (para lavagem do material). Após esta desinfestação superficial, foi realizada a maceração em solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada e então, com alça de platina, transferida uma alíquota do macerado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, realizando-se estrias compostas. Em seguida, as placas foram identificadas, invertidas e incubadas a 25 °C, observando-se seu crescimento após 48 h.

3.3 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano & Assis (2000). Foi preparada uma suspensão da bactéria teste a partir da cultura em placas com 48 h de incubação. Foram ajustadas concentrações bacterianas para obter leituras de absorvância a 560 nm de 1,2; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,0. Cada uma das suspensões foi diluída até 10^8 , 10^7 e 10^6 .

Foram pipetados 0,05 mL de cada diluição e espalhado uniformemente com alça de vidro flambada e esfriada em placas de Petri com meio ágar-nutriente, preparando-se quatro placas para cada diluição, as quais foram invertidas e incubadas a 25 °C por 48 h. Foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis (que apresentasse entre 30 a 300 colônias) para cada absorvância. Os dados de unidades formadoras de colônia (UFCs) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente uma equação de regressão.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.4.1 Obtenção de extrato bruto aquoso de *P. sanguineus*

Basidiocarpos de *P. sanguineus* (Figura 1) foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná e posteriormente secos em temperatura constante de 30 °C para serem moídos em moinho de facas. O preparo de extratos aquosos (EA) constituiu na hidratação do pó seco de basidiocarpos por 24 h à temperatura de 4 °C (mantidos em geladeira), na proporção de 14 mL de água destilada para 1g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel filtro Whatman nº 1 (FIORI-TUTIDA, 2003; DI PIERO & PASCHOLATI, 2004). Os filtrados coletados foram submetidos a uma nova filtragem de esterilização em sistema Millipore com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, em câmara de fluxo laminar. Esses filtrados armazenados em geladeira a 4 °C foram utilizados após diluições para obter as concentrações de 1; 5; 10; 15 e 20% para os testes *in vitro* e nas concentrações de 5 e 10% para os ensaios de proteção de plantas (ASSI, 2005).



Figura 1. Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Fonte: TOILLIER, S. L.

3.4.2 Micélio de *P. sanguineus* obtido do cultivo em meio líquido

Foram preparados 100 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose), para cada frasco, nos quais foram repicados cinco discos contendo meio de cultura mais micélio de *P. sanguineus*, crescido por 14 dias em meio BDA e em escuro a 25 °C, sob agitação (150 rpm). Após vinte dias, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1. O micélio retido no filtro foi colocado em estufa a 40 °C até obtenção de peso constante e posteriormente macerado em almofariz de porcelana para obtenção do pó. Esse pó de micélio foi hidratado em água destilada nas proporções definidas em 3.3.1 e utilizado nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

3.4.3 Extrato do filtrado da cultura de *P. sanguineus*

Foi utilizado o filtrado de cultura de *P. sanguineus* obtido em 3.3.2, posteriormente diluído para obter as concentrações indicadas em 3.3.1 e utilizado nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para este ensaio foi preparado meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne: 3 g; peptona: 5 g; glicose: 15 g; água destilada: 1.000 mL) (MARIANO & ASSIS, 2000). O meio com as diferentes concentrações do extrato de *P. sanguineus* (1, 5, 10, 15 e 20%) foi colocado em tubos de ensaio (10 mL tubo⁻¹). Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizado por espectrofotômetro, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Apenas o meio de cultura foi utilizado como tratamento controle. Este procedimento também foi realizado para o extrato de *P. sanguineus* esterilizado por filtração (membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro).

3.6 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Foi realizado o ensaio com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com os seguintes tratamentos: a) testemunha ou controle negativo: plantas tratadas com água destilada; b) controle positivo nº 1: bactericida sistêmico – agrimicina (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina); c) controle positivo nº 2: indutor de resistência – acibenzolar-S-metil (125 mg i.a. L⁻¹); d) extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*; e) extrato do micélio de *P. sanguineus* e f) extrato do filtrado da cultura de *P. sanguineus*. As concentrações dos extratos ficaram definidas como 5 e 10%. Os tratamentos foram aplicados três dias antes da inoculação do patógeno.

Os extratos em quantidade de 3 mL foram aplicados na primeira folha trifoliada. A inoculação do patógeno em questão foi realizada na primeira folha trifoliada tratada, bem como na segunda folha trifoliada não tratada, para se observar a ocorrência de proteção local e/ou sistêmica, respectivamente. As inoculações foram realizadas na parte da manhã, mediante aspersão de suspensão de inóculo contendo 5 X 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polipropileno com água destilada aspergida para simular câmara úmida por 24 h (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000). Após esse período, a câmara úmida foi removida e as plantas ficaram nas condições ambientais da casa de vegetação.

No experimento em casa de vegetação com inoculação do patógeno, a avaliação da severidade do cretamento bacteriano comum foi realizada ao final do experimento, ou seja, 12 dias após os tratamentos, por determinação da área lesionada, com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE et al., 2003).

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.7.1 Coleta de amostras para análise bioquímica

Foram coletados três quadrados (1 cm^2) de folha por amostra com no momento dos tratamentos e também nos 3º, 6º, 9º e 12º dias após os tratamentos. Durante o procedimento de amostragem, cada amostra foi imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio, previamente identificados, e congeladas. Foram coletadas amostras das primeiras folhas trifoliadas inoculadas (tratadas), bem como das segundas folhas trifoliadas não-inoculadas (não-tratadas).

3.7.2 Obtenção dos extratos protéicos

As amostras do tecido vegetal coletadas foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) – tampão de extração, em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 14.500 rpm (20.000 g) durante 25 min a $1 \text{ }^\circ\text{C}$ (KUHN, 2007). O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi congelado para posterior determinação do conteúdo protéico total e da atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase, fenilalanina amônia-liase.

3.7.3 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 100 μL do extrato enzimático, 700 μL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) – preparação enzimática, e 200 μL 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 foi expressa em termos equivalentes de μg albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (μg

proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

3.7.4 Determinação da atividade da peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada a 30 °C em banho-maria, através de método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982).

A mistura da solução consistiu de 2,9 mL de uma solução contendo 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 0,1 mL de preparação enzimática. A cubeta de referência consistiu de 3,0 mL de solução contendo 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm e as leituras foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

3.7.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PFO) foi determinada usando-se a metodologia de Douangmal & Apenten (1999). O ensaio consistiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima em estudo. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 950 µL do substrato e 50 µL do extrato enzimático (item 3.6.2). A temperatura de reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 1,3 min. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína⁻¹.

3.7.6 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada a 37 °C por espectrofotometria direta medida pela conversão de L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico a 290 nm, por modificação proposta por Stangarlin et al. (2005) na metodologia de Pascholati et al. (1996) e Peltonem & Karjalein (1995). A mistura de reação conteve 250 µL do extrato da amostra e 1.250 µL de L-fenilalanina 12 mM em tampão Tris-HCL 50 mM (pH 8,5). A cubeta de referência continha 250 µL de tampão Tris-HCl e 1.250 µL de L-fenilalanina 12 mM. A atividade enzimática foi expressa pela atividade específica (μg de ác. trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína $^{-1}$) (STANGARLIN et al., 2005).

3.7.7 Determinação da atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (HAPHB) (Stangarlin et al., 2000). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 1 h, continha 50 µL de tampão de extração, 200 µL do extrato protéico e 250 µL de laminarina ($4,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL de uma solução de HAPHB (0,5 g dissolvidos em 10 mL de HCL 0,5 M, acrescido de 40 mL de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em gelo as amostras tiveram a absorbância determinada a 410 nm. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e os resultados expressos em mg de glicose $\text{h}^{-1} \text{mg}$ proteína $^{-1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de *P. sanguineus* sobre o crescimento bacteriano de *X. axonopodis* pv. *phaseolus* indicou que o extrato de micélio estimulou o crescimento da bactéria de forma dose-dependente (Figura 2). O filtrado apenas a 20% reduziu em 21% o crescimento bacteriano (Figura 3). O extrato de basidiocarpo em 15 e 20% reduziu 91% em média o crescimento bacteriano, comportando-se estatisticamente igual ao antibiótico, que reduziu o crescimento em 81% (Figura 4). O acibenzolar-S-metil (ASM) não apresentou atividade antibiótica (Figuras 2, 3 e 4).

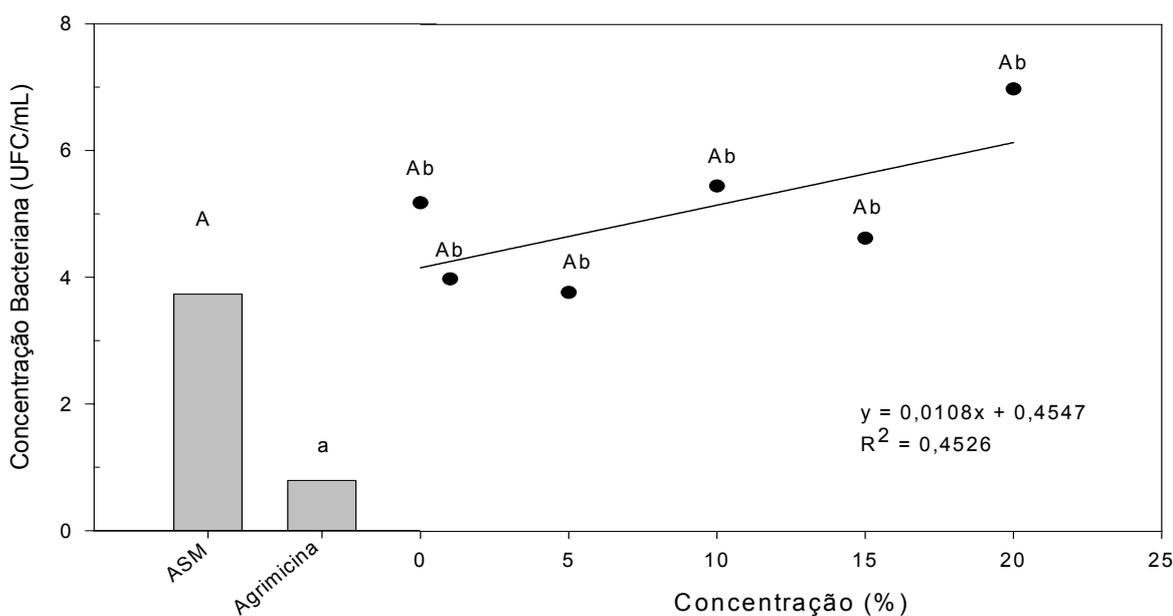


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de micélio de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com o efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

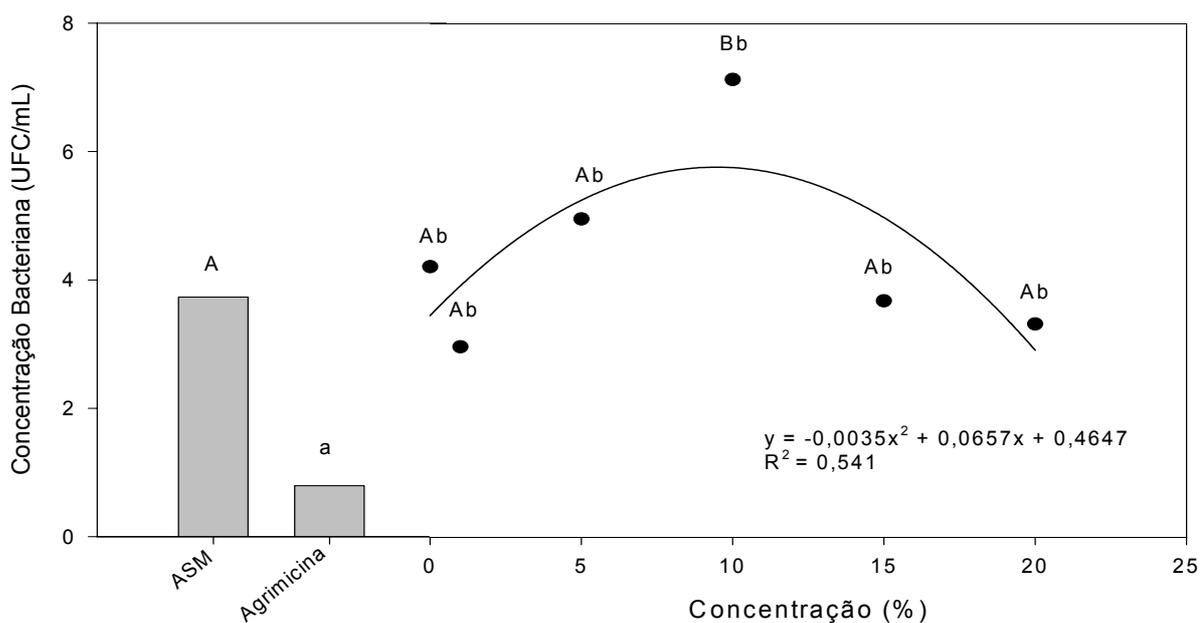


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com o efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

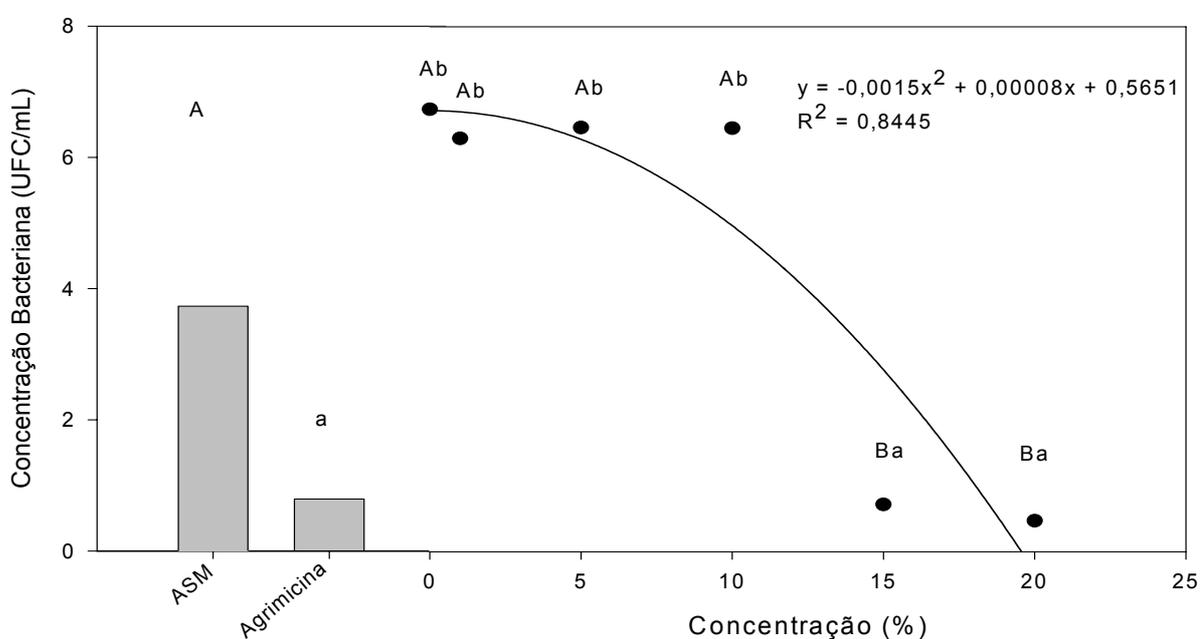


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com o efeito de antibiótico (agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Para Baldo (2008a), a análise dos dados do ensaio *in vitro* da germinação de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum* Lams-Scrib, revelou que os extratos aquosos de basidiocarpo de *P. sanguineus* tiveram efeito inibitório na germinação de esporos em até 97%, sendo esta inibição muito próxima ao fungicida. Semelhantemente Assi (2005) observou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* reduziram a germinação *in vitro* de esporos de *C. lindemuthianum* com inibições de até 96%.

Viecelli et al. (2008) puderam verificar no ensaio de inibição de germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun, que extratos de micélio de *P. sanguineus* a partir da concentração 5% inibiram significativamente a germinação de esporos, enquanto extratos de basidiocarpos e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* não apresentaram efeito significativo.

Baldo et al. (2008b) observaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações 5, 10, 15 e 20 % inibiram significativamente ($P < 0,05$) a germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus* e *Phakopsora euvitis*, sendo que o extrato a 5% inibiu em 78,8 % a germinação de *P. euvitis* e a 20% inibiu em 72,9% a germinação de *U. appendiculatus* em relação à testemunha água.

Na inibição de crescimento micelial de *C. lindemuthianum*, Baldo (2008a) notou que para todos os extratos e concentrações avaliadas, não houve inibição e/ou indução do crescimento micelial em relação aos controles água e ASM. O fungicida inibiu o crescimento micelial em até 85% quando comparado aos demais tratamentos. Ao passo de que Assi (2005) pôde verificar que os extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* estimularam o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em até 48% quando comparados ao controle água.

Viecelli et al. (2008) observaram que o extrato aquoso de micélio de *P. sanguineus* a 20% não inibiu o crescimento micelial de *P. griseola* quando comparado ao fungicida azoxystrobin, porém este extrato a 15% foi tão fungitóxico quanto o ASM.

4.2 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE

As condições climáticas no período para inoculação do patógeno em casa de vegetação não se mostraram favoráveis para o seu desenvolvimento, apresentando baixa severidade, fato esse também ocorrido nos ensaios de Viecelli (2008) com *P. griseola*. Para Baldo (2008a) & Assi (2005), a antracnose apresentou moderada severidade, determinada pela inoculação realizada com esporos do patógeno e favorecida pela suscetibilidade do cultivar e pela ocorrência de condições ambientais favoráveis à doença.

De acordo com os dados apresentados para avaliação de severidade (Figura 5) pode-se perceber que tanto para a primeira folha tratada e inoculada (A) quanto para a segunda folha apenas inoculada (B), a severidade foi menor nas plantas tratadas com filtrado de cultura de *P. sanguineus* a 5 e 10%. Em A, o tratamento de filtrado de cultura a 5%, a redução da doença, quando comparado à água, foi de 33,44% e com o uso do filtrado de cultura a 10%, foi de 21,73% ao passo de que em B, tanto o tratamento com filtrado a 5% quanto a 10%, reduziram em 56, 88% a severidade, quando comparados com a testemunha água. Na folha tratada e inoculada apenas os tratamentos com extrato de basidiocarpo 5%, filtrado 5 e 10%, extrato de micélio 10% e antibiótico reduziram significativamente a severidade, embora sem diferença do extrato de basidiocarpo a 10%, micélio 5% e ASM.

Isso indica que os tratamentos utilizados podem ter induzido tanto resistência local quanto sistêmica, sendo que nesta última, não houve ocorrência de doença nas folhas que receberam esses tratamentos, embora sem diferença estatística dos tratamentos com extratos de basidiocarpo e micélio, antibiótico e ASM.

Os resultados obtidos são semelhantes aos dados apresentados por Assi (2005), o qual utilizou extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* e verificou que pode ser uma alternativa em cultivos orgânicos, em função destes apresentaram níveis de controle similares aos obtidos pelo fungicida, além do custo do controle com estes extratos ser inferior ao controle com fungicidas do cultivo convencional, fato este que, associado ao melhor preço do feijão cultivado organicamente, renderia ao produtor um lucro relativamente maior.

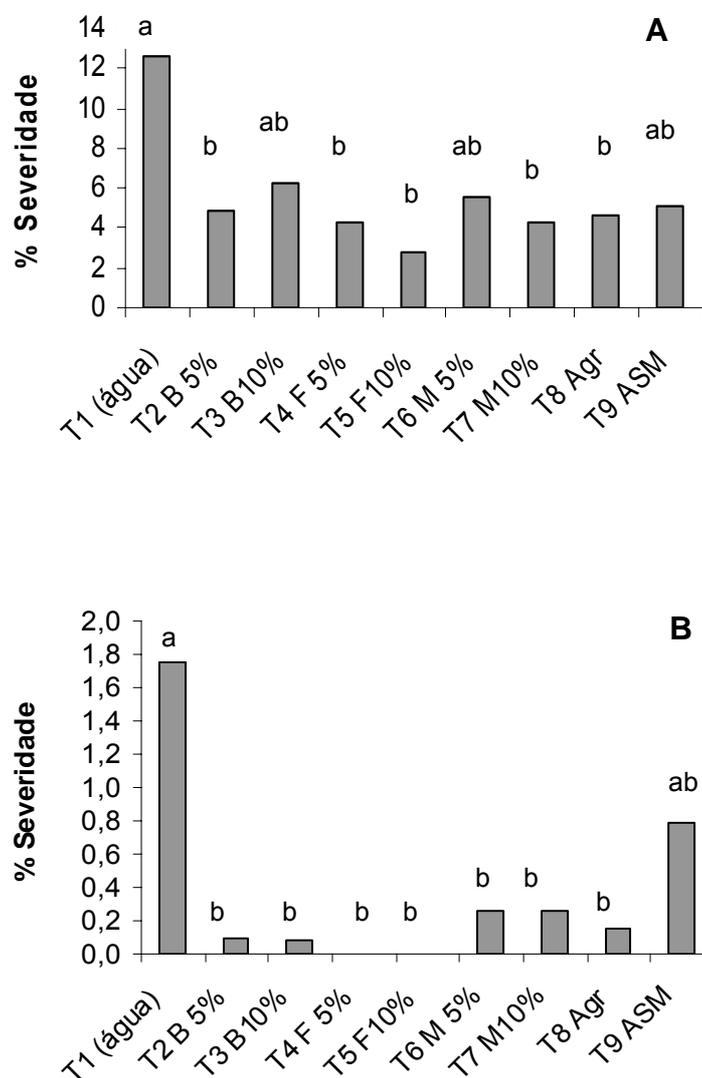


Figura 5. Severidade para crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseolus* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de basidiocarpo (B) e de micélio (M) e filtrado de cultura (F) de *P. sanguineus* em concentrações de 5 e 10%, na primeira folha tratada e inoculada (**A**) e na segunda folha (**B**) apenas inoculada, em condições de casa de vegetação. Agr: antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina); ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg i.a. L⁻¹); Água: testemunha. Médias seguidas de mesma letra (a/b), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4.3 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

4.3.1 Teor de proteína

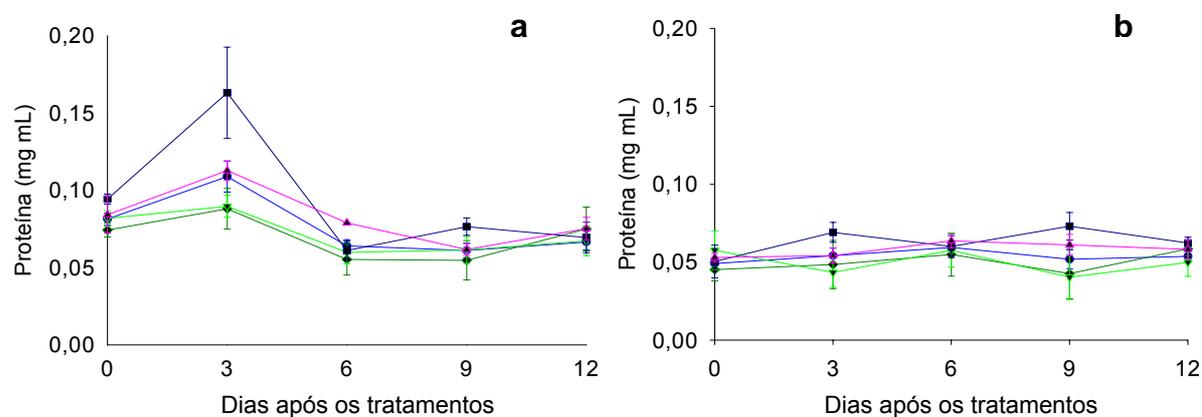
Muitos trabalhos são encontrados na literatura, que ressaltam o papel das proteínas nos mecanismos de defesa das plantas (PASCHOLATI & LEITE, 1995; MORAES, 1992).

O teor de proteína teve alteração aos 3 DAT (dia após os tratamentos) na 1ª folha tratada e inoculada com os extratos de basidiocarpo, micélio e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* (Figura 6), com aumentos de até 40% no incremento da atividade de proteínas totais quando comparados a testemunha água.

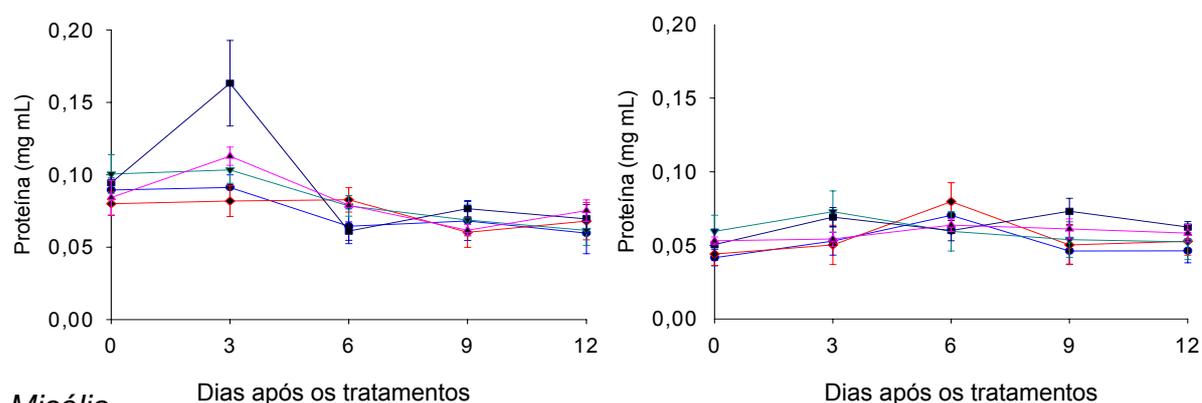
Na 2ª folha apenas inoculada com o patógeno desafiador, os picos de indução observados pelos extratos aplicados tiveram incrementos na atividade de proteínas totais de até 130%, quando comparados à testemunha água, podendo indicar indução de resistência sistêmica.

Viecelli (2008) verificou em seu trabalho com feijoeiro tratado com extratos de *P. sanguineus* que houve alteração significativa no conteúdo protéico, dessa forma, quando as enzimas investigadas no estudo (peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase) eram divididas pelo conteúdo protéico o resultado foi a redução drástica das mesmas, quando expressadas pelo peso das amostras, resultado satisfatório foi verificado, o mesmo encontrado no presente trabalho.

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

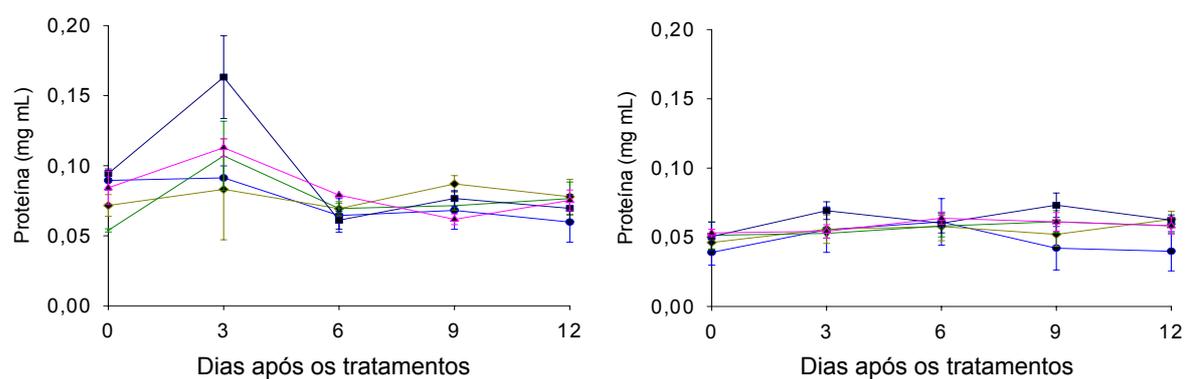


Figura 6. Teor de proteína em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). (a) e (b) representam respectivamente a 1^a folha tratada e inoculada, e a 2^a folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

4.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

4.4.1 Atividade de peroxidase

As plantas de feijão que receberam extratos de basidiocarpo e de micélio e filtrado de cultura na 1ª folha, tratada e inoculada, bem como na 2ª folha, não tratada e inoculada, apresentaram oscilação no incremento da atividade de peroxidase quando comparados às testemunhas água, antibiótico e ASM (Figura 7).

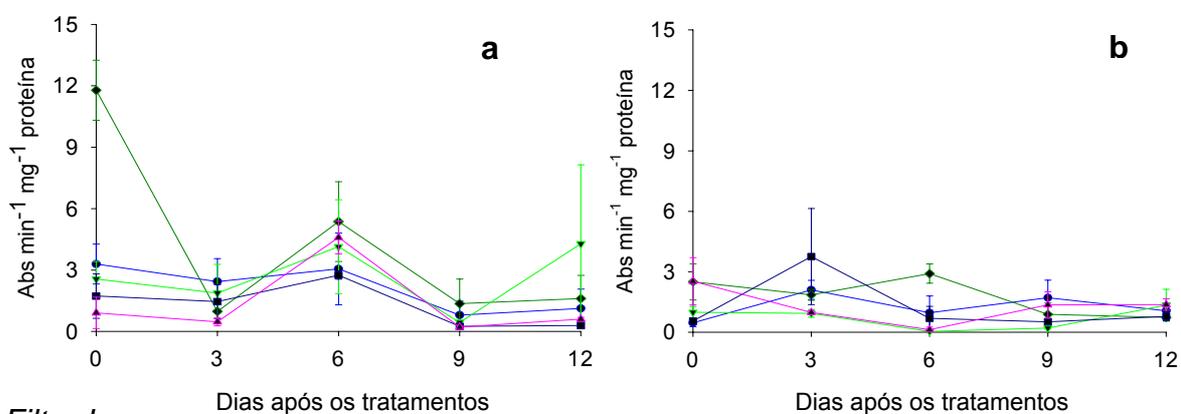
Para o extrato de basidiocarpo a 10% na 1ª folha, observou-se incremento da atividade de peroxidase aos 6 DAT, diminuindo sua expressão no 9 DAT e voltando novamente ao mesmo patamar de expressão observado no 6 DAT para o 12 DAT, quando comparado às testemunhas e aos demais tratamentos, sendo superior ao ASM em 90% no 6 DAT e à testemunha água em 135% no 12 DAT, apesar de não ter diferido estatisticamente das testemunhas. O micélio a 10% foi superior em 200% à testemunha água aos 6 DAT e o filtrado de cultura a 5% apresentou incrementos na atividade da peroxidase de forma mais expressiva no 6 DAT, sendo 165% superior à testemunha água.

No momento da inoculação do patógeno (3 DAT) a maior atividade específica da peroxidase na 2ª folha foi observada no tratamento com filtrado a 5 e 10%, sendo que o primeiro foi 76% superior à testemunha água e o segundo, 65%. O EA de basidiocarpo a 5% e o filtrado a 10%, apresentaram maior atividade aos 6 DAT, com o primeiro sendo superior à testemunha água em mais de 300% e o segundo em 65%.

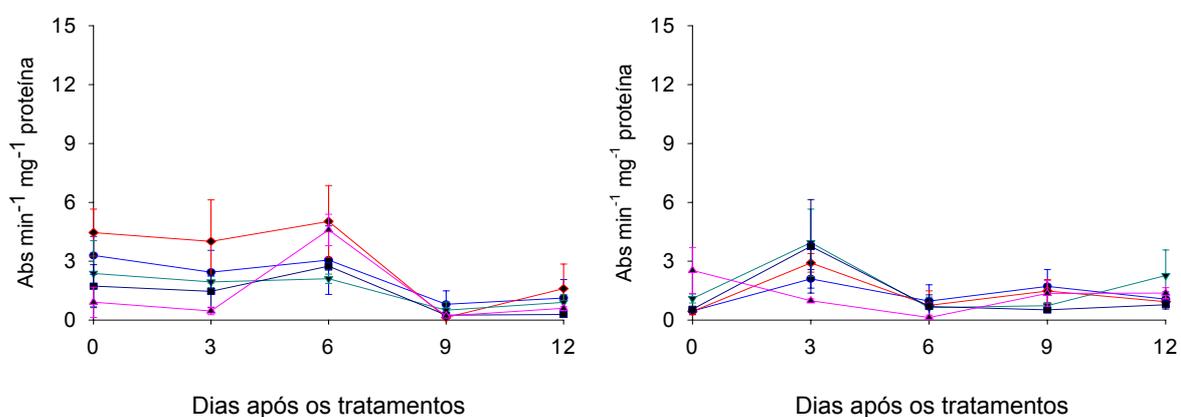
Baldo (2008a) observou incremento na atividade da peroxidase em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* em feijoeiro, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito em função dos tratamentos, resultado esse também encontrado por Viecelli (2008).

Para Meinerez et al. (2007), o extrato bruto de basidiocarpo de *P. sanguineus* na concentração de 5%, promoveu incremento na atividade de peroxidase de 41% em cotilédones de soja, ao passo que, o ASM promoveu resultados semelhantes à testemunha água. Já Iurkiv et al. (2008a), puderam observar que a aplicação de

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

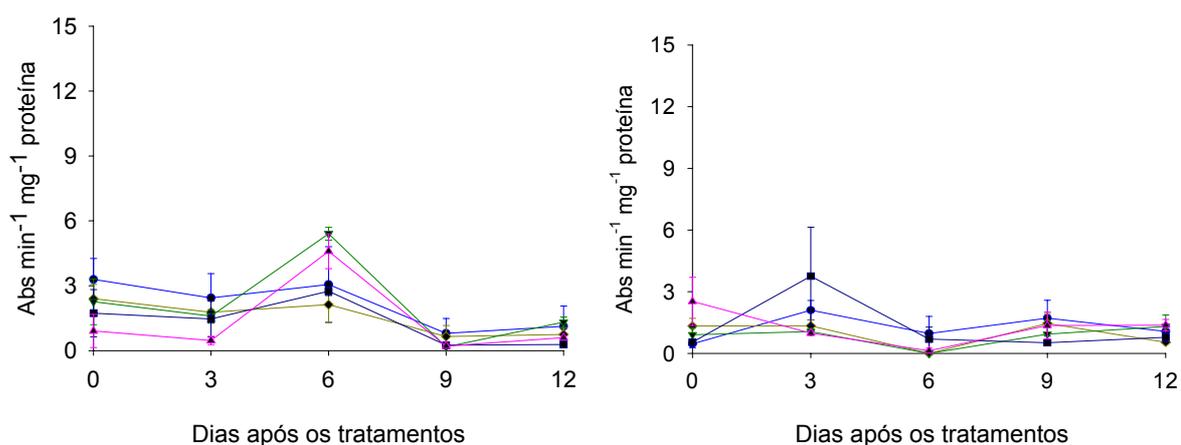


Figura 7. Atividade específica de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 20%, apresentou característica supressora da atividade de peroxidase em cotilédones de soja, proporcionando redução de 61,6% na atividade em relação a testemunha água.

Beninca (2007), avaliando a indução de peroxidases, verificou que os extratos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *P. sanguineus*, em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja, inibiram a atividade enzimática, sendo que a indução verificada para o extrato hexânico em sorgo não diferiu do controle ASM, e em soja a atividade foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferir do tratamento com ASM.

4.4.2 Atividade de polifenoloxidase

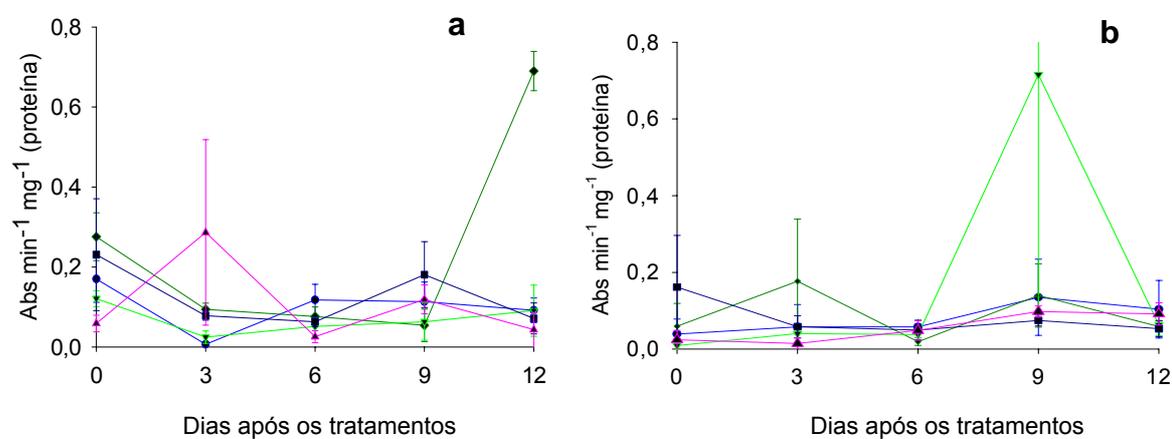
A atividade da polifenoloxidase com aplicação dos EA de *P. sanguineus* em plantas de feijão apresentou incremento de forma significativa quando comparados às testemunhas água, antibiótico e ASM (Figura 8).

A maior atividade específica de polifenoloxidase na 1ª folha foi com o EA de basidiocarpo a 5% aos 12 dia, ao passo que na 2ª folha, sua maior atividade foi a 10% no 9 dia comparando-se com todos os tratamentos em ambas as folhas, com o EA de basidiocarpo a 5% superior ao ASM em 1000% e o basidiocarpo a 10%, superior em 500% à testemunha água. O filtrado a 10% na 1ª folha, aos 9 DAT foi superior à testemunha água em 150%. O micélio a 10% na 1ª folha, quando comparado a testemunha água aos 12 DAT foi superior em 44%. Para o micélio a 5% no momento da inoculação do patógeno (3 DAT) na 2ª folha, a atividade apresentou-se de forma acentuada, sendo superior à água em 240%, com estabilização da expressão no decorrer dos dias.

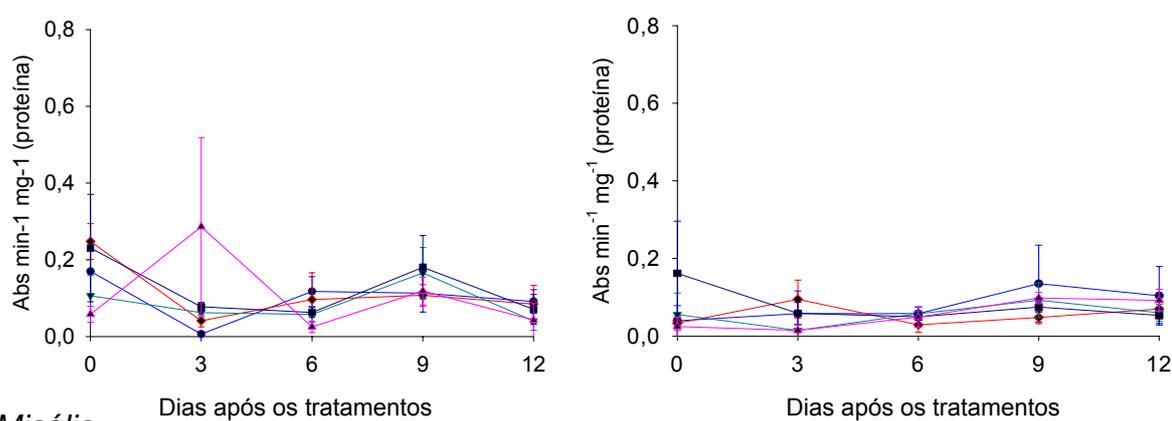
Viecelli (2008) concorda com os resultados obtidos neste trabalho, pois verificou que a atividade desta proteína foi influenciada pelos tratamentos com extratos de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito. Por outro lado, Baldo (2008) pôde observar que a aplicação de EA de *P. sanguineus* em plantas de feijão não induziu incrementos significativos na atividade específica de polifenoloxidase.

Baldo (2008) ainda, verificou que pelo somatório da atividade específica da polifenoloxidase, os extratos testados não induziram o aumento desta enzima, mas

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

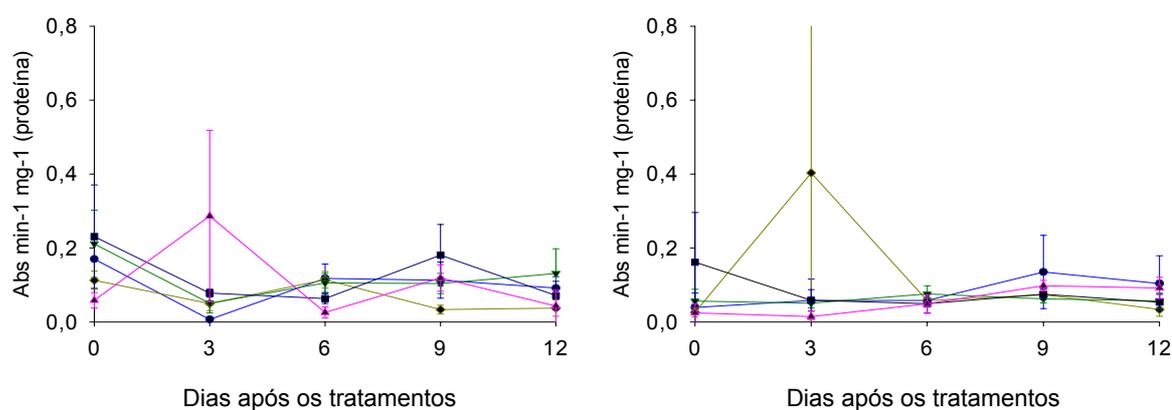


Figura 8. Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

tiveram uma redução de 37% no tratamento com basidiocarpo a 10% em relação à água para a 1ª folha. Resultado este semelhante ao encontrado por Meinerz et al. (2007) com relação ao somatório da atividade específica promovido pelo ASM, onde a atividade da polifenoloxidase não diferiu estatisticamente da testemunha água, além do decréscimo da atividade com o aumento da concentração do extrato de basidiocarpo também ter sido observado.

Kuhn (2007) pôde observar que a atividade específica de polifenoloxidase em feijoeiro não foi alterada em função dos indutores *B. cereus* e ASM, enquanto Itako et al. (2008) observaram indução da atividade específica de polifenoloxidase em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e inoculadas com *Alternaria solani*.

Ainda para Viecelli (2008), 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.

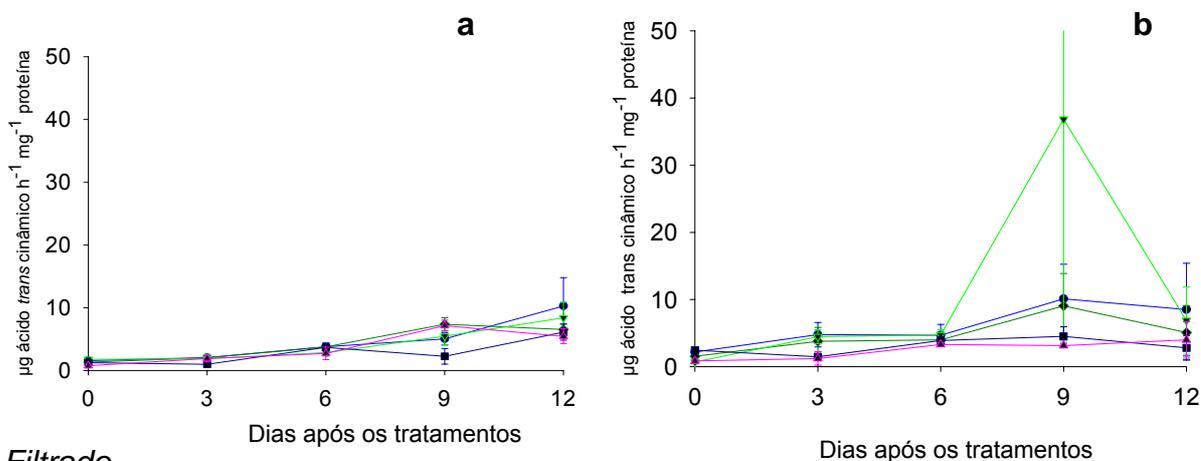
4.4.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade específica de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijão com extratos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*, sofreu leve incremento de atividade no decorrer dos dias em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*, local (1ª folha, tratada e inoculada) e sistemicamente (2ª folha, apenas inoculada).

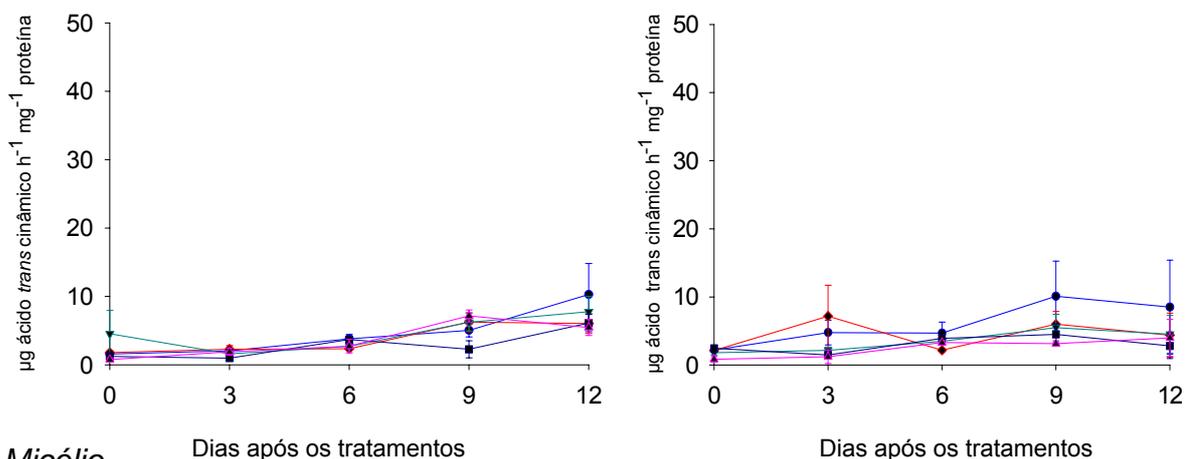
Na 1ª folha tratada e inoculada, todos os tratamentos comparados às testemunhas tiveram comportamento semelhante, verificando aqui, que a indução de resistência não foi ativada em função dos tratamentos, mas do patógeno desafiador aplicado. Pode-se observar apenas que o extrato de micélio a 10% proporcionou incremento na atividade da FAL em 460% quando comparado ao antibiótico.

Na 2ª folha apenas inoculada, a maior expressão da enzima ocorreu aos 9 DAT no tratamento com o EA de basidiocarpo a 10%, superior à testemunha água em mais de 1000%.

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

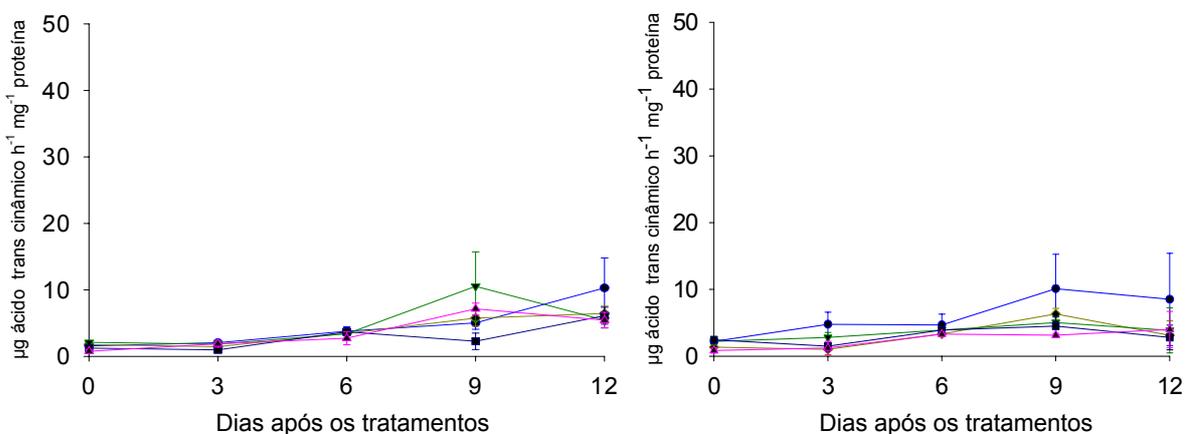


Figura 9. Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L^{-1} de oxitetraciclina + 225 mg L^{-1} de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L^{-1}) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). Barras indicam a média \pm o erro padrão.

De modo geral, a análise estatística indica que não houve incrementos significativos na atividade específica da FAL com a utilização dos extratos de *P. sanguineus*, o mesmo pôde ser observado por Kuhn (2007) em feijoeiros tratados com *Bacillus cereus* e ASM. Segundo o autor, isto pode significar que toda a rota dos fenilpropanóides não sofreu alterações, como por exemplo, os mecanismos de síntese de lignina, compostos fenólicos, quinonas entre outros.

Por outro lado, Baldo (2008a) pôde observar que a aplicação de extratos de *P. sanguineus* em plantas de feijão provocou aumentos local e sistêmico na atividade específica de fenilalanina amônia-liase, bem como Gális et al. (2004) que puderam verificar a indução de resistência sistêmica em feijoeiro com ácido salicílico e o aumento na expressão da FAL.

4.4.4 Atividade de β -1,3 glucanase

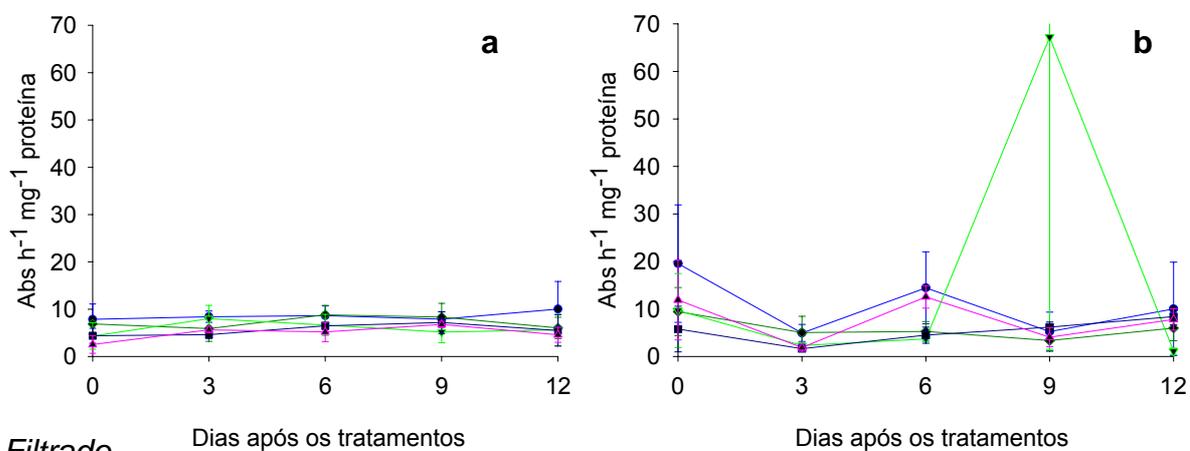
Assim como para FAL, a atividade específica de β -1,3 glucanase sofreu leve incremento de atividade no decorrer dos dias em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* em feijoeiro, local e sistemicamente.

Observou-se que na 2ª folha apenas inoculada, a expressão da atividade foi maior aos 9 DAT com o extrato de basidiocarpo a 10%, superior a água em 1200%, indicando proteção sistêmica. E o filtrado de cultura a 10% foi superior à testemunha água em 100%.

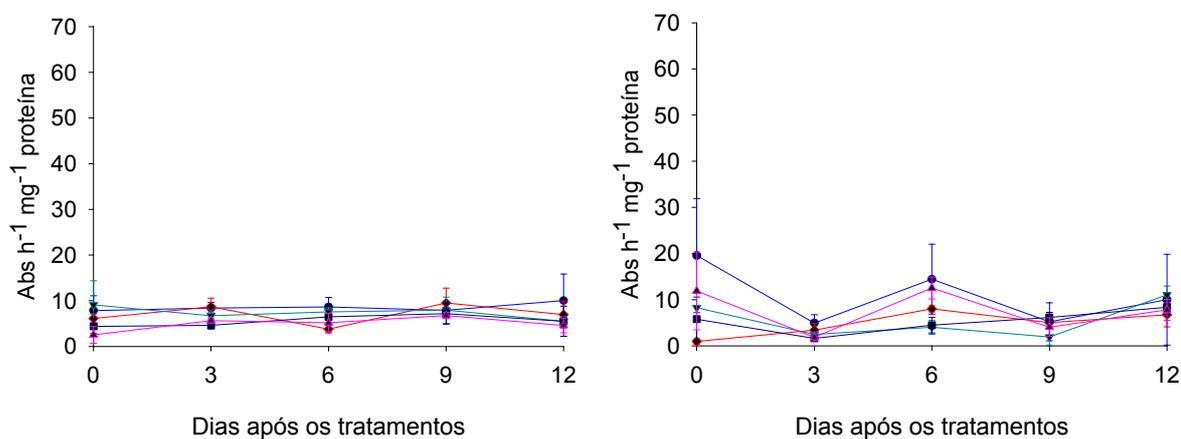
Estes resultados concordam com Kuhn (2007) que verificou em feijoeiros tratados com *B. cereus* o não aumento significativo da atividade específica de β -1,3 glucanases, enquanto que o indutor abiótico ASM aumentou significativamente a atividade desta enzima. De acordo com Viecelli (2008) a atividade 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. Guarda & Di Piero (2007) observaram aumento da atividade de glucanases em plantas de feijão tratadas com quitosana e inoculadas com *C. lindemuthianum*, em relação às testemunhas.

Lurkiv et al. (2008b) verificaram que a fração (4º pico protéico) obtida a partir da aplicação de extrato bruto de basidiocarpo de *P. sanguineus* em coluna de

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

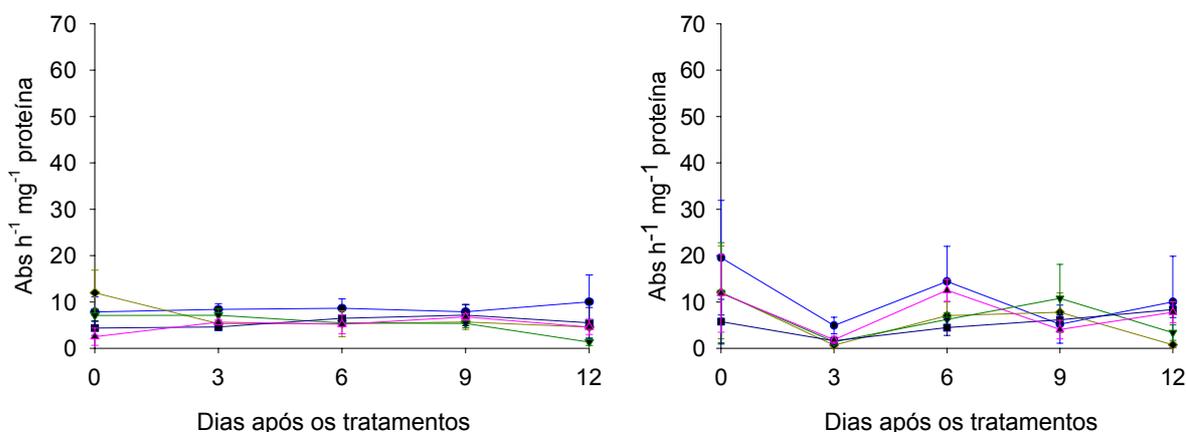


Figura 10. Atividade específica de β -1,3-glucanase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (●), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ▼), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ▼) e micélio a 5 e 10% (◆ e ▼). Barras indicam a média +/- o erro padrão.

cromatografia de filtração em gel, induziu a atividade específica de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja, superior em 260,5% à testemunha água.

Fiori-Suzuki et al. (2008) verificaram aumento da atividade de β -1,3 glucanases em maracujazeiros inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e tratados com extratos de *L. edodes* e *A. blazei* nas concentrações 20 e 40%.

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.

Segundo 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.

5 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de enzimas de defesa vegetal como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3 glucanase, com conseqüente redução da severidade da doença.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v.95, p.269-273, 1991.
- ANTONIAZZI, N. **Desenvolvimento de cevada em resposta ao uso de elicitores para o controle de *Bipolaris Sorokiniana***. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005. 74p.
- ASSADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.
- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2005. 51p.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2008a, 83p.
- BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.94, 2008b.
- BENINCA, C.P. **Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2007, 45p.
- 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**. 4ed. Editora Ceres, São Paulo – SP: 2005. p.333-349.
- 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**, 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, 2006, p.13-18.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BURG, I. C.; MAYER, P. H. Introdução. In: **Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. 1ed. Francisco Beltrão: Grafiti, 1998, p.13.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 129-134, 2003.

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 elicitação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.12, p.1721-1730, dez. 2006.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005a. 263p.

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, 2005b. p.81-124.

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**. 1996, p.461-466.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

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

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 Phytopatologica**, 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, 2005. p.29-50.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.

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

EMBRAPA. Arroz e Feijão. 2004. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br>. Acesso em: 14.07.06.

FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO M. J.; FARIA L. C. de. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002.

FIDALGO, O. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. **Rickia**, v.2, p.1-10, 1995.

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

FIORI TUTIDA, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* w *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, in vitro. Notas científicas, **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.113-118, 2007.

FIORI-SUZUKI, C. C. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B. Ativação da enzima glucanase em folhas de plantas de maracujazeiro tratadas com extratos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.104, 2008.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agriannual 2005: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.333-339: **Feijão**.

GÁLIS, I.; SMITH, J. L.; JAMENSON, P. E. Salicylic acid, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.459-466, 2004.

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

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F. J.; GREPPIN, H. A. A two step control of basic and acid peroxidase and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, v.64, p.418-423, 1985.

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

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

GUARDA, M. V.; DI PIERO, R. M. Atividade de glucanases e peroxidases em plantas de feijão tratadas com quitosana. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40, Maringá, 2007. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), p.184, 2007.

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

HERMANN, K.M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50, p.473-503, 1999.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. Indicadores IBGE: estatística da produção agropecuária, maio 2008. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE. Acesso em: junho de 2008.

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.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BALBI-PEÑA, M. I. Polifenoloxidase induzida por óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em folhas de tomate inoculadas com *Alternaria solani*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.54, 2008.

IURKIV, L.; BALDO, M.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; KHUN, O. J.; MEINEREZ, C. C. Atividade de peroxidases em cotilédones de soja tratados com frações de *Pycnopus sanguineus* obtidos a partir de cromatografia de filtração em gel (CFG). Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.104, 2008a.

IURKIV, L.; BALDO, M.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; KHUN, O. J.; MEINEREZ, C. C. Atividade de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja tratados com frações parcialmente purificadas de *Pycnopus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.104, 2008b.

KIMATI, H Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos**. Vol.1. São Paulo: Ceres, 1995.

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

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.

LAGRIMINI, L.M.; BURKHART, W.; MOYER, M; ROTHSTEIN, S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidases from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p.7542-7546, Botany, November, 1987.

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

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

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species.** Australian National Botanic Gardens, Fungi. Disponível em: <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html>. 2007. Acesso em: 22.12.2007.

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

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.49-52.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. **Manual de práticas em fitobacteriologia.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.27-35.

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.

MEINEREZ, C. C.; BALDO, M.; FRANZENER, G.; YURKIV, L.; BRAGA, C. L.; KUHN, O.; STANGARLIN, J. R. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *P. sanguineus*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40, Maringá, 2007. **Fitopatologia Brasileira**, v.32(suplemento), p.304, 2007.

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**, v.162, p.491-498, 2002.

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

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C. et al. (Orgs.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.261-84, 1998.

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. R.; SOUZA, R. M. Feijão comum. Controle de doenças. Doenças causadas por bactérias. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas – grandes culturas**. Vol.1. Os editores: UFV. 1997. p.423-450.

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

PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. Vol.1. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. 1995. p.417-454.

PASCHOLATI, S.F., STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E. **Sugestões para o cultivo de cogumelos comestível "shiitake" em mourões de eucalipto**. FEALQ – Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz – ESALQ-USP, 1996, 19p.

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.

PELTONEN, S.; KARJALAINEN, R. Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with *Bipolaris sorokiniana* or treatment with its purified xylanase. **Journal of Phytopathology**, v.143, p.239-245, 1995.

PÉREZ-SILVA, E.; AGUIRRE-ACOSTA, E.; PÉREZ-AMADOR, Y. C. Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en Mexico. **Revista Mexicana de microbiología**, v.4, p.137-144, 1998.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa: Brasília, 1994. p.217-242.

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

ROSOLEM, C. A.; MARUBAVASHI, O. M.OSVALDO M. Seja o doutor feijoeiro. **Encarte de Informações Agronômicas** - Nº 68 - DEZEMBRO/94. Potafós, arquivo do agrônomo, nº7, 1994.

RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, v.113, p.175-179, 1997.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.8, n.10, p.1809-1819, 1996.

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 Fosfato.1996. p.669-722.

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

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e 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, 2005. p.125-138.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. Appl. Environm. **Microbiology**, vol.67, p.2883-94, 2001.

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

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

SILVA, L. H. C. P. **Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-Smetil contra doenças em tomateiro**. 2002. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.

SILVA, M. B. C; CASTRO, N.F; CAVALCANTI, M.A. **O potencial biotecnológico de fungos que causam a podridão da madeira**. In: 54° 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. F.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr) Murr. **Journal of ethnopharmacology**, 45, p.177-181, 1995.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, Jr.; LEITE, C. L. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4, 1998.

- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, 132:1-45. 1996.
- STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano II, n.11, p.16-21, nov/dez de 1999.
- 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, p.34-42, 2000.
- STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C. A. Efeito de *Phaeosariopsis 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.; FRANZENER, G. Phenols, β -1-3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turicum* in maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v.31, n.3, p. 261-267, 2005.
- STINTIZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINONOGLUS, S., KAUFFMAN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M. & FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie** 75:687-706. 1993.
- STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORN, J. B. (Eds.), **Plant biochemistry**. Academic Press: London, p.387-416, 1997.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4ed. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 794p. 2006.
- TEBALDI, N. D.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, v.32(1), p.56-58, jan-fev 2007. Parte da tese de doutora da primeira autora. Universidade Federal de Lavras.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, p.105. 2003
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Review Food Science Nutritional**, v.15, p.49-127, 1981.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, Th.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Rep. 12:245-64, 1994.

VIECELLI, C. A. **Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnopus sanguineus***. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 60p, 2008.

VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Efeito *in vitro* de extratos de *Pycnopus sanguineus* sobre *Pseudocercospora griseola*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.52, 2008.

VIEIRA, C; JÚNIOR, T. J. de P; BORÉM, A. **Feijão**. 2ed. Viçosa; UFV, 600p, 2006.

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

WATANABE, R. A. M.; JÚNIOR, H. M. O.; GARCIA, T. A.; SANTIAGO M. F. Tratamento do efluente da indústria farmacêutica com os fungos selecionados: *Pycnopus 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.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.1001-1013, 1995.

WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O. R. (Ed.) **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York : Marcel Dekker Inc, p.543-556, 1994.

XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, v.187, p. 4286-4289, 2005.

YOKOYAMA, L. P. Importância econômica. In: **Cultivo do feijoeiro comum**, 2003. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>. Acesso em 15.07.06.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol Oxidases. In ROBISON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.) **Oxidative Enzymes in Foods**, p.217-273, 1991.

ZHAO, H. et al. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.44, p.36-40, 2005.