

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

LUCIANA IURKIV

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS A PARTIR
DE *Pycnoporus sanguineus* PARA O CONTROLE DE FERRUGEM ASIÁTICA EM
SOJA**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2009

LUCIANA IURKIV

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS A PARTIR
DE *Pycnopus sanguineus* PARA O CONTROLE DE FERRUGEM ASIÁTICA EM
SOJA**

Dissertação apresentada a 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
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço a minha família, meus pais Alice Mazur lurkiv e Estefano lurkiv, e meus irmãos Ana Márcia lurkiv, Erivelton lurkiv, Andréa Cristina lurkiv e Tatiane lurkiv pelo incentivo e apoio.

Ao meu orientador Professor Dr. José Renato Stangarlin, pela oportunidade, paciência e ajuda em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Odair José Kuhn pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento de metodologias.

À Mauricele Baldo e Cristiane Cláudia Meinerz, as quais estiveram constantemente presentes e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

Ao professor Cléber Furlanetto pela ajuda e disponibilidade no desenvolvimento de diversas metodologias.

Aos amigos Luciana Pazzini, Michelle Walter, Gitana Peres Peres, Élton Carlos Schneider, Klaus Zachow, Karine Zachow, pela amizade e companheirismo, estando sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos, tristes ou felizes.

Aos colegas de pós-graduação, principalmente a Márcia Vargas Toledo e Luciana Cleci de Oliveira, que estiveram presentes no desenvolvimento deste trabalho e me apoiaram para a realização do mesmo.

A todos os professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

À EMBRAPA Soja pela permissão e auxílio no desenvolvimento de experimentos em sua unidade.

À Cláudia Godoy e Allan Flausino pelo auxílio e orientações durante o desenvolvimento de experimentos na unidade da EMBRAPA Soja, além dos demais funcionários pela receptividade e amizade durante o este período.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desta obra.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| RESUMO..... | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 A cultura da soja..... | 20 |
| 2.2 A doença ferrugem asiática..... | 21 |
| 2.3 Mecanismos de resistência nas plantas | 22 |
| 2.4 Indução de resistência..... | 23 |
| 2.5 Fitoalexinas | 24 |
| 2.6 Proteínas relacionadas à defesa | 25 |
| 2.6.1 β -1,3 glucanases | 25 |
| 2.6.2 Peroxidases..... | 26 |
| 2.6.3 Fenilalanina amônia-liase..... | 26 |
| 2.6.4 Polifenoloxidasas..... | 27 |
| 2.6.5 Quitinases..... | 28 |
| 2.7 Aplicação de extratos de basidiocarpos no controle de doenças | 28 |
| 2.8 O fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 29 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| 4 CAPÍTULO I – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM COTILÉDONES DE SOJA POR FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL A PARTIR DE BASIDIOCARPOS DE <i>P. sanguineus</i> | 36 |
| RESUMO..... | 36 |
| ABSTRACT | 37 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.2.1 Obtenção do extrato bruto de <i>P. sanguineus</i> | 39 |
| 4.2.2 Cromatografia de filtração em gel (CFG)..... | 40 |
| 4.2.3 Determinação da indução de fitoalexinas e enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja | 40 |
| 4.2.3.1 Determinação de fitoalexinas..... | 41 |
| 4.2.3.2 Determinação de enzimas relacionadas à defesa | 41 |
| 4.2.3.2.1 Obtenção da preparação enzimática | 41 |
| 4.2.3.2.2 Atividade de peroxidases | 41 |
| 4.2.3.2.3 Atividade de polifenoloxidasas..... | 42 |
| 4.2.3.2.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase..... | 42 |
| 4.2.3.2.5 Atividade de β -1,3 glucanases..... | 43 |
| 4.2.3.2.6 Atividade de quitinasas | 43 |
| 4.2.3.2.7 Determinação de proteínas totais | 44 |
| 4.2.4 Análise dos resultados..... | 44 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.3.1 Purificação parcial através de cromatografia de filtração em gel (CFG)..... | 45 |
| 4.3.2 Indução de fitoalexinas | 46 |
| 4.3.3 Atividade de peroxidases..... | 48 |
| 4.3.4 Atividade de polifenoloxidasas..... | 50 |
| 4.3.5 Atividade de β -1,3 glucanases..... | 51 |
| 4.3.6 Atividade de fenilalanina amônia-liase..... | 52 |
| 4.4 CONCLUSÃO | 53 |
| 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |
| 5. CAPÍTULO II – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM COTILÉDONES DE SOJA POR FRAÇÕES OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA A PARTIR DE BASIDIOCARPOS DE <i>P. sanguineus</i> | 58 |
| RESUMO..... | 58 |
| ABSTRACT | 59 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 60 |

| | |
|--|----|
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 5.2.1 Obtenção do extrato bruto de <i>P. sanguineus</i> | 61 |
| 5.2.2 Precipitação fracionada do extrato de basidiocarpo de <i>P. sanguineus</i> | 62 |
| 5.2.3 Determinação da indução de fitoalexinas e enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja | 62 |
| 5.2.4 Análise dos resultados..... | 63 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |
| 5.3.1 Indução de fitoalexinas | 63 |
| 5.3.2 Atividade de peroxidases..... | 65 |
| 5.3.3 Atividade de polifenoloxidasas..... | 66 |
| 5.3.4 Atividade de β -1,3 glucanases..... | 67 |
| 5.3.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase..... | 69 |
| 5.4 CONCLUSÃO | 70 |
| 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |
| 6. CAPÍTULO III – CONTROLE DE FERRUGEM ASIÁTICA PELA UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES PARCIALMENTE PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL E PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA DE <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 74 |
| RESUMO | 74 |
| ABSTRACT | 76 |
| 6.1 INTRODUÇÃO..... | 78 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 79 |
| 6.2.1 Localização do experimento | 79 |
| 6.2.2 Atividade antimicrobiana contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 80 |
| 6.2.3 Utilização de frações provenientes da CFG e da precipitação com sulfato de amônio no controle de ferrugem asiática..... | 80 |
| 6.2.3.1 Coleta de amostras para análises bioquímicas e fisiológicas..... | 81 |
| 6.2.3.2 Determinação de enzimas relacionadas à defesa | 81 |
| 6.2.3.3 Determinação de pigmentos fotossintetizantes | 81 |
| 6.2.3.4 Severidade da doença..... | 82 |
| 6.2.4 Análise dos resultados..... | 82 |

| | |
|--|-----|
| 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 83 |
| 6.3.1 Atividade antimicrobiana contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 83 |
| 6.3.2 Controle de ferrugem asiática..... | 85 |
| 6.3.3 Enzimas relacionadas à defesa..... | 89 |
| 6.3.3.1 Atividade de peroxidases..... | 89 |
| 6.3.3.2 Atividade de polifenoloxidasas..... | 91 |
| 6.3.3.3 Atividade de β -1,3 glucanases..... | 93 |
| 6.3.3.4 Atividade de quitinase..... | 96 |
| 6.3.3.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase..... | 98 |
| 6.3.4 Alterações fisiológicas | 100 |
| 6.3.4.1 Teor de clorofila a | 100 |
| 6.3.4.2 Teor de clorofila b | 103 |
| 6.3.4.3 Teor de carotenóides | 106 |
| 6.4 CONCLUSÃO | 108 |
| 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 109 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 113 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 4.1 Cromatografia de filtração em gel obtida a partir de extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* aplicado em coluna de vidro (1 cm x 60 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), e eluido com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, sendo coletadas frações de 1 mL, num fluxo de 1 mL min⁻¹ 45
- FIGURA 4.2 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fitoalexinas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV% = 30,82. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹) 47
- FIGURA 4.3 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de peroxidases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV% = 19,05. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹) 49
- FIGURA 4.4 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV% = 22,58. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹) 50
- FIGURA 4.5 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV% = 47,90. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹). 51
- FIGURA 4.6 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. CV% = 73,07. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹). 52

FIGURA 5.1 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fitoalexinas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 20,96. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹)..... 64

FIGURA 5.2 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de peroxidases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 16,12. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹)..... 65

FIGURA 5.3 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 26,24. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹)..... 67

FIGURA 5.4 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 26,58. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹)..... 68

FIGURA 5.5 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fenilalanina amônialiase em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 35,04. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹)..... 69

FIGURA 6.1 Número de lesões de ferrugem asiática por cm² em trifólio tratado com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* e inoculado (A), e em trifólio inoculado (B), de plantas de soja. Barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 41,30. Pico III, IV e V: frações protéicas obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG); Pico carb.: fração com carboidrato obtida por CFG; C. 40-60, C.60-80, C.80-100: frações protéicas obtidas por precipitação com concentração com sulfato de

amônia de 40-60, 60-80 e 80-100%, respectivamente; Tebucon: fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹) 86

FIGURA 6.2 Número de urédias de ferrugem asiática por lesão em trifólio tratado com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* e inoculado (A), e em trifólio inoculado (B), de plantas de soja. Barras representam a média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 32,33. Pico III, IV e V: frações protéicas obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG); Pico carb.: fração com carboidrato obtida por CFG; C. 40-60, C.60-80, C.80-100: frações protéicas obtidas por precipitação com concentração com sulfato de amônia de 40-60, 60-80 e 80-100%, respectivamente; Tebucon: fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹). 87

FIGURA 6.3 Atividade de peroxidases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 36,44 89

FIGURA 6.4 Atividade de peroxidases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 36,44 90

FIGURA 6.5 Atividade de polifenoloxidasas em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 1,09. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$ 92

FIGURA 6.6 Atividade de polifenoloxidasas em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 1,09. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$. 93

FIGURA 6.7 Atividade de β -1,3 glucanases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 29,17.....94

FIGURA 6.8 Atividade de β -1,3 glucanases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 29,1795

FIGURA 6.9 Atividade de quitinase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 19,73.....96

FIGURA 6.10 Atividade de quitinases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 19,73.97

FIGURA 6.11 Atividade de fenilalanina amônialiase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 37,29.....98

FIGURA 6.12 Atividade de fenilalanina amônia-liase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de

basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 37,29 99

FIGURA 6.13 Teor de clorofila *a* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 21,37 101

FIGURA 6.14 Teor de clorofila *a* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 21,37 102

FIGURA 6.15 Teor de clorofila *b* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 24,75 104

FIGURA 6.16 Teor de clorofila *b* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 24,75 105

FIGURA 6.17 Teor de carotenóides em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 16,73 106

FIGURA 6.18 Teor de carotenóides em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte

60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 16,73 107

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 Massa molecular (Mm) de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel do extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus*..... 46

TABELA 6.1 Inibição da germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* por frações parcialmente purificadas de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguneus*..... 84

RESUMO

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A aplicação de extratos brutos visando à indução de mecanismos de resistência é uma alternativa interessante ao controle químico, entretanto, nestes extratos pode ocorrer além da presença de indutores, a presença de supressores. Este trabalho teve por objetivo a purificação parcial, por meio de cromatografia de filtração em gel (CFG) e precipitação com sulfato de amônio (SA), de compostos presentes em extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus*, eficientes no controle de ferrugem asiática em soja por indução de resistência. Extrato bruto de *P. sanguineus* foi submetido à cromatografia de filtração em gel, sendo obtidos cinco picos protéicos e um pico glícido, com pesos moleculares variando de 1,82 a 5,18 KDa. Foi efetuada a precipitação fracionada das proteínas presentes em 100 mL de extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*. As frações obtidas foram: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% de SA. Cotilédones de soja incisados foram tratados com as frações provenientes da CFG e precipitação com SA, além dos tratamentos extrato bruto a 20% (EB 20%), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e água. Após incubação pelo período de 20 h efetuou-se análises bioquímicas dos cotilédones para verificar os teores de fitoalexinas, peroxidases, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase. Os tratamentos obtidos por CFG frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V (1,82 KDa), e glícida, além das frações 40-60, 60-80 e 80-100% obtidos por saturação com SA foram selecionados para avaliação de atividade antimicrobiana e de indução de resistência em soja contra *P. pachyrhizi* em casa de vegetação, utilizou-se também extrato bruto (EB) 20% de basidiocarpo de *P. sanguineus* e as testemunhas fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹) e água. Visando avaliar o controle da doença ferrugem asiática e indução de enzimas relacionadas à defesa, montou-se ensaio em casa de vegetação onde plantas foram tratadas e após três dias inoculadas com o patógeno. Amostras foram coletadas 0, 1, 3, 6 e 9 dias após os tratamentos para análises bioquímicas e a severidade foi avaliada após 13 dias. Os dados referentes à avaliação de atividade antimicrobiana mostram que as frações não possuem atividade inibidora da germinação de esporos. Quanto à severidade, a fração III e o EB 20% foram eficientes na redução do número de lesões por cm². Para peroxidases, o EB 20% apresentou tendência em reduzir a atividade enzimática. Quitinases e polifenoloxidasas não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Para β -1,3 glucanases houve indução local pelas frações glícida e protéicas III e V, e pelas frações 40-60% e 60-80% em relação ao EB 20%, sendo que o mesmo apresentou indução sistêmica para essa enzima. Para fenilalanina amônia-liase as frações purificadas de *P. sanguineus* apresentaram tendência em reduzir a atividade enzimática, com exceção para EB 20%. Foi possível induzir mecanismos de defesa em soja contra *P. pachyrhizi* pela aplicação de frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus*, o que pode permitir o desenvolvimento de métodos alternativos para controle desse patógeno.

Palavras chaves: indução de resistência, cromatografia de filtração em gel, precipitação fracionada por sulfato de amônio, *Pycnoporus sanguineus*, *Phakopsora pachyrhizi*.

**PARTIAL PURIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM
Pycnoporus sanguineus FOR THE CONTROL OF SOYBEAN ASIAN RUST**

ABSTRACT

Induced resistance involves the activation of latent defense mechanisms in plants in response to the treatment with biotic or abiotic agents. The use of crude extracts aimed at inducing resistance mechanisms is an interesting alternative to chemical control, however, in this extracts can occurs besides de presence of inducers, the presence of suppressors. This work objectived a partial purification, through gel filtration chromatography (GFC) and by ammonium sulphate (AS) precipitation, of compounds in basidiocarps crude extracts from *Pycnoporus sanguineus* efficient to the control of Asian rust in soybean by induction of resistance. Crude extracts from *P. sanguineus* were submitted to gel filtration chromatography (GFC), and five proteins and one carbohydrate peaks were obtained, with molecular weight ranging from 1,82 to 5,18 KDa. It was made the fractionated protein purification from 100 mL of crude extract from *P. sanguineus*. The fractions obtained were: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100% of ammonium sulphate. Incised soybean cotyledons were treated with fractions from GFC and AS precipitation, crude extract 20% (EB 20%), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) and water. After incubation during 20 h, was made biochemical analyses to verify the phytoalexins content and peroxidases, polyphenoloxidases, β -1,3 glucanases and phenylalanine ammonia-lyase activities. The treatments from GFC, protein fractions III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) and V (1,82 KDa), and carbohydrate fraction, fractions 40-60%, 60-80% and 80-100%, obtained by ammonium sulphate precipitation, crude extract (CE) of basidiocarps at 20%, besides control treatments fungicide (tebuconazole, 0,5 g a.i. L⁻¹) and water were used to evaluate the antimicrobial activity and induction of resistance in soybean against *P. pachyrhizi* in greenhouse. Soybean plants were treated and after three days were inoculated with the pathogen. Samples were collected 0, 1, 3, 6 and 9 days after the treatment for biochemical analyses and the severity was evaluated after 13 days. The data referring to evaluation of antimicrobial activity show that the fractions do not have inhibiting activity of germination of spores. As for severity, the treatments protein fraction III and CE 20% were efficient in the reduction of the number of injuries for cm². For peroxidase the CE 20% presented tendency in reducing the enzymatic activity. Chitinases and polifenoloxidases did not presented statistical differences between the treatments. For β -1,3 glucanases there was local induction for the treatments with glicide fraction and protein fractions III and V, and fractions 40-60% and 60-80%, while CE 20% presented systemic induction for this enzyme. For phenylalanine ammonia-lyase the purified fractions of *P. sanguineus* reduced the enzymatic activity, except for CE 20%. It was possible to induce defense mechanisms in soybean against *P. pachyrhizi* for the application of partially purified fractions from *P. sanguineus*, indicating its possible use as an alternative method for controlling this pathogen.

Key words: induction of resistance, gel filtration chromatography, ammonium sulfate precipitation, *Pycnopus sanguineus*, *Phakopsora pachyrhizi*.

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais culturas exploradas principalmente no sul e centro-oeste do Brasil, sendo este um dos principais produtores mundiais desse grão. Em vista disso, a soja possui destacada importância econômica e social no país. A produção nacional de soja na safra de 2007 foi de cerca de 58 milhões de toneladas e a expectativa para a safra de 2008 gira em torno de 60 milhões de toneladas (IBGE, 2008).

Apesar da alta produção, a sojicultura enfrenta graves problemas fitossanitários, como a ferrugem asiática, um dos mais recentes e mais importantes deles, sendo responsável por perdas significativas na produção. A doença é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, e foi constatada pela primeira vez, no Brasil, na safra 2001/2002. O patógeno encontrou, nas condições brasileiras, ambiente extremamente favorável ao seu desenvolvimento, que aliado à presença de hospedeiro suscetível favorece a ocorrência de epidemias constantes (EMBRAPA, 2006).

O controle desta doença é baseado na aplicação de fungicidas, o que se deve principalmente à eficiência e praticidade proporcionada por esse método. Entretanto, graves problemas ambientais decorrem desse tipo de controle. Entre os principais pode-se citar a contaminação ambiental pelos resíduos dos produtos aplicados e seleção de isolados resistentes do patógeno.

Visando a redução e a racionalização da utilização de produtos químicos no controle de fitopatógenos, tem-se buscado desenvolver alternativas eficientes, as quais evitem produzir os danos associados ao controle químico convencional. A indução de resistência surge como alternativa a este, buscando o controle de doenças pela aplicação de agentes bióticos e abióticos capazes de ativar os mecanismos naturais de defesa das plantas, sem qualquer alteração em seu genoma.

A utilização de extratos de basidiocarpos vem demonstrando satisfatória eficiência como indutores de mecanismos de defesa em plantas contra fitopatógenos. Vários são os exemplos da utilização eficiente desses extratos no controle de doenças em diferentes patossistemas. Dentre eles pode-se citar pepino-*Colltotrichum lagenarium* (DI PIERO et al., 2006), tomate-*Xanthomonas vesicatoria* (DI PIERO & PASCHOLATI,

2004), trigo-*Bipolaris sorokiniana* (FIORI-TUTIDA, 2003), feijão-*Colletotrichum lindemuthianum* (ASSI, 2005; BALDO, 2008) e feijão-*Pseudocercospora griseola* (VIECELLI, 2008), entre outros.

A purificação parcial de elicitores a partir de extratos brutos visa concentrar o princípio ativo e se constitui numa ferramenta de grande importância no estudo e caracterização de moléculas com potencial indutor de resistência. Para tanto, o presente trabalho teve por objetivo purificar parcialmente, através de cromatografia de filtração em gel e precipitação fracionada com sulfato de amônia, compostos elicitores de fitoalexinas e de proteínas de defesa vegetal, a partir de extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* e testar sua eficiência no controle de ferrugem asiática em soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine Max* L.) é uma leguminosa herbácea anual cujo alto teor protéico de seus grãos (38%) e sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima e fotoperíodo, devido a suas variedades, a colocam entre as principais oleaginosas do mundo, sendo entre elas a mais cultivada (BERTRAND et al., 1987).

A cultura da soja representa um dos elementos mais fortes da economia do Brasil. Apesar de praticamente desconhecida até a década de 60, a soja se impõe no início da década de 80 como a principal cultura de exportação do país. Não ocupando mais que 200.000 hectares em 1960, estendeu-se por mais de 8 milhões em 1981, ou seja, perto de 16% das terras agricultáveis disponíveis no país (BERTRAND et al., 1987).

A produção de soja no Brasil concentrou-se na Região Centro-Sul até o início dos anos 80. A partir daí, a participação da Região Centro-Oeste aumentou significativamente (EMBRAPA, 2000).

A produção de soja no Paraná na safra de 99/00 foi de 7,1 milhões de toneladas, e que a produção total do país foi de 31,4 milhões (EMBRAPA, 2000). Na safra 2006/2007 a produção de soja chegou a cerca de 58 milhões de toneladas, sendo a produção na safra 2007/2008 de cerca de 60 milhões (IBGE, 2008).

Em trabalho realizado objetivando analisar o número de empregos gerados pelo agronegócio da soja, Roessing & Lazzarotto (2004) constataram que o complexo da soja é capital-intensivo. No total chegou-se a 4,5 milhões de postos de trabalho gerados pelo agronegócio da soja. Apesar do setor agropecuário estar classificado em terceiro lugar na criação de empregos, o setor específico da soja está entre os mais capital-intensivos do agronegócio.

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Os danos anuais de produção por doenças são estimados em cerca

de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar danos de quase 100% (EMBRAPA, 2006).

2.2. A DOENÇA FERRUGEM ASIÁTICA

Na safra 2001/2002 uma nova doença, a ferrugem asiática da soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, foi detectada desde o Rio Grande do Sul até o Mato Grosso. Na safra seguinte espalhou-se praticamente para todas regiões produtoras representando uma ameaça para a cultura, em função dos prejuízos causados e do aumento do custo de produção para seu controle (EMBRAPA, 2006).

Yorinori & Lazzarotto (2004) realizando levantamento sobre a situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul, constataram que o total de prejuízos causados pela ferrugem em 2003 (somatório das perdas de grãos, dos gastos com controle e da queda de arrecadação) chegou a ordem de US\$ 1,29 bilhão, aumentando em 2004, quando atingiu a ordem de US\$ 2,28 bilhões.

Phakopsora pachyrhizi foi identificada em praticamente todas as regiões produtoras de soja no Brasil, exceto no Estado de Roraima. A doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento varia entre 18 e 26,5 °C. Em condições ótimas, os danos na produtividade podem variar de 10% a 80% (EMBRAPA, 2006). Desde o ano de 2001, epidemias da doença têm sido constatadas em algumas regiões do Brasil. Na safra 2001/2002, as lavouras mais atingidas apresentaram queda na produtividade de até 70% (REUNIÃO, 2002).

A doença manifesta-se de forma irregular. O sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo-avermelhada, na parte superior da folha. Em infecções severas, as lesões podem coalescer, formando grandes manchas castanhas, e causar o amarelecimento e queda da folha. Na parte inferior da folha, a lesão é de coloração castanho-clara a castanho-escura, tendo uma pequena elevação no centro, de coloração mais clara. Essa parte mais clara do centro constitui a cutícula que cobre a massa de uredósporos produzida no interior do tecido da folha (ALMEIDA et al., 1997).

A infecção por *P. pachyrhizi* causa rápido amarelecimento ou bronzeamento e queda prematura das folhas. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior a perda do rendimento e da qualidade (grãos verdes). Em casos severos, quando a doença atinge a soja na fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar o aborto e a queda das vagens, resultando até em perda total da produção. A agressividade do patógeno tem variado de safra para safra em diferentes regiões em função das condições climáticas (EMBRAPA, 2006).

As principais medidas de controle, de acordo com Yorinori & Lazzarotto (2004), são: semear, preferencialmente, cultivares mais precoces e no início da época recomendada para cada região (semeaduras tardias sofrerão mais danos devido à multiplicação do fungo nos primeiros cultivos), cujo objetivo é escapar do período de maior potencial de inóculo do fungo; evitar cultivos adensados, pois dificultam que o fungicida atinja os terços médio e inferior das plantas; e aplicação de fungicidas recomendados, quando necessário.

A sobrevivência de *P. pachyrhizi*, na entre-safra, tem ocorrido em cultivos de soja sob irrigação no inverno, mas pode também ocorrer em hospedeiros alternativos, pois *P. pachyrhizi* infecta 95 espécies de plantas, em mais de 42 gêneros. Ainda não se tem, entre os cultivares recomendados, materiais com bom nível de resistência (EMBRAPA, 2006). Isto se deve, em parte, a recente ocorrência da doença no país, mas também devido ao fato de o fungo possuir diversas raças com genes múltiplos de virulência (SINCLAIR & HARTMAN, 1995). Para tanto, o controle químico com fungicidas registrados ainda é a forma de controle mais recomendada para a doença (EMBRAPA, 2006).

2.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS

Assume-se em Fitopatologia, que imunidade é regra e suscetibilidade exceção. Se assim não fosse, qualquer patógeno seria capaz de infectar qualquer planta e, a curto prazo, em termos evolutivos, os vegetais desapareceriam da face da Terra. Isso

não acontece exatamente porque os mecanismos de defesa de plantas contra patógenos existem em multiplicidade e são extremamente eficientes (Romeiro, 1999).

Segundo Pascholati & Leite (1995), a resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos.

Os mecanismos de resistência são geralmente subdivididos em: pré-formados (ou passíveis, constitutivos) e pós-formados (ou ativos, induzíveis). Os fatores de resistência pré-formados incluem aqueles já presentes nas plantas antes do contato com os patógenos. No caso dos pós-formados, estes mostram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta a presença dos patógenos. Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que as reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que mostram-se tóxicas ao patógeno e criam condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

São exemplos de cada grupo:

- Pré-formados:
 - Estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores.
 - Bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos.
- Pós-formados:
 - Estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses.
 - Bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese.

2.4. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes bióticos ou abióticos antes da inoculação dos patógenos e sem qualquer alteração do genoma da planta. Isso ocorre de maneira não específica, de forma local ou sistêmica, através da ativação de genes que codificam para diversas

respostas de defesa tais como: proteínas relacionadas à patogênese, enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas e acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do patógeno, entre outros (BONALDO, 2005).

A proteção das plantas contra fitopatógenos, através da resistência induzida, exhibe vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural de proteção; transmissão por enxertia; e presença do potencial genético para resistência nas plantas suscetíveis (PASCHOLATI, 2003).

Resende (2003) afirma que o controle da expressão de genes de defesa, específicos e não específicos, permite o estabelecimento de resistência multigênica de amplo espectro, diminuindo a pressão de seleção sobre as populações do patógeno.

Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos intencionando o desenvolvimento de compostos protetores não-antibióticos, capazes de ativar o potencial natural de resistência em várias plantas (MÉTRAUX, 2007). Reconhece-se, portanto, o grande potencial de tais compostos como uma nova geração de produtos para controle de doenças, reduzindo o uso de fungicidas e oportunizando o uso de agentes de biocontrole (LYON & NEWTON, 1997).

2.5. FITOALEXINAS

As fitoalexinas são definidas como compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, que são sintetizados pelas plantas e que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (BRAGA, 2008). Talvez seja a resposta de defesa a patógenos mais bem estudada nas plantas, as quais constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, sendo que diferentes famílias botânicas usam distintos produtos secundários como fitoalexinas (TAIZ & ZEIGER, 2004). No caso da soja, a fitoalexina gliceolina mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos. Sua síntese ocorre em resposta à infecção e também pelo tratamento com agentes bióticos (BURDEN & BAILEY, 1975). A síntese de fitoalexinas pode ser induzida por compostos denominados elicitores, os quais podem ser de origem microbiana (elicitor exógeno) ou da própria planta (elicitor endógeno).

Quimicamente, os elicitores bióticos são formados, de modo geral, por moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas e lipídios (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

As fitoalexinas são considerados compostos biocidas, sendo prejudiciais a bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais. De forma geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas (CAVALCANTI et al., 2005).

As fitoalexinas apresentam grande diversidade e mais de trezentos tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarina, diterpeno e flavonóide, entre outros, tendo sido identificados em mais de vinte famílias de vegetais superiores (CAVALCANTI et al., 2005).

2.6. PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA

2.6.1. β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39)

As β -1,3-glucanases são extensamente distribuídas entre bactérias, fungos e plantas. Baseado nas reações de hidrólise catalizadas pela glucanase, β -1,3-glucanases são classificadas em exo- β -1,3-glucanases e endo- β -1,3-glucanases. β -1,3-glucanases são importantes na proteção de plantas durante a invasão fúngica, através da sua capacidade de hidrolizar a β -1,3-glucana, principal componente da parede celular dos fungos (PANG et al., 2004).

São monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa e que produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina, uma β -1,3-glucana. Existem diferentes isoformas dessa enzima e grande variação entre elas quanto à atividade catalítica relativa sobre o substrato laminarina (CAVALCANTI et al., 2005). Exibem formas básicas, que ocorrem normalmente intracelularmente (nos vacúolos), e ácidas, que ocorrem extracelularmente, e possuem ação imediata na defesa das plantas, pela ação direta nas hifas invasoras (MARTINS, 2008).

2.6.2. Peroxidases (EC 1.11.1.7)

As peroxidases são enzimas presentes nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, e são responsáveis por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (CAVALCANTI et al., 2005). Entre eles destaca-se a síntese de lignina, no qual os álcoois de fenilpropano são unidos em um polímero pela ação dessa enzima, que cataliza a oxidação desses álcoois, gerando radicais livres intermediários que se associam de forma não enzimática em uma disposição ao acaso para formar lignina (TAIZ & ZEIGER, 2004). A lignina ou processo de lignificação pode interferir com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Além disso, peroxidases têm sido relacionadas à uma variedade de processos envolvidos na defesa, incluindo respostas de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexinas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992).

As peroxidases são específicas para o aceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e peróxidos, mas inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos. As peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 kDa, conhecidas como enzimas de função dupla, pois são capazes de gerar o H_2O_2 que lhes servirá de substrato (CAVALCANTI et al., 2005).

2.6.3. Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia-liase é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido

caféico, ácido ferúlico, e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

A FAL 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).

2.6.4. Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)

Polifenoloxidase (PFO) ou agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenois) transformando-os em quinonas (*o*-quinonas) constituindo uma atividade de difenolase. Porém, em algumas plantas, essas enzimas podem também catalizar a *o*-hidroxilação de monofenois, constituindo atividade de monofenolase (MAYER & HAREL, 1987). São também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002). Estas enzimas são amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, sendo encontradas também em várias espécies de bactérias, numerosos fungos e algas (MAYER & HAREL, 1987).

A polifenoloxidase geralmente é abundante em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 1997). Essa enzima está diretamente envolvida no processo de escurecimento em alimentos, principalmente em frutas e vegetais, durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO et al., 2003). As polifenoloxidasas e peroxidases lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (CAMPOS et al., 2004).

2.6.5. Quitinases (EC 3.2.1.14)

As quitinases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilglicosamina). Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que a quitina mostra-se como um dos principais constituintes da parede celular fúngica. Além disso, a atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta a infecção e a tratamentos hormonais e químicos. Assim como as β -1,3 glucanases, as quitinases são agrupadas entre as “Proteínas Relacionadas a Patogênese” (Proteínas-RP) e exibem formas ácidas e básicas (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Van Loon & Van Strien (1999) classificaram as Proteínas Relacionadas à Patogênese com atividade na hidrólise de quitina nas famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11, todas endoquitinases. Em função da atividade ser bastante específica dentre uma gama de substratos, sugere-se além das famílias, a classificação por classes. De acordo com esses autores, várias quitinases têm mostrado propriedades antifúngicas, porém restrita a determinados fungos.

2.7. APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE BASIDIOCARPOS NO CONTROLE DE DOENÇAS

Dentre os diversos agentes bióticos e abióticos, utilizados em trabalhos de indução de resistência de plantas a patógenos, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* vêm se destacando (SILVA, 2007). Porém, extratos de outras espécies vêm sendo estudados para esse fim, como é o caso do fungo *Pycnoporus sanguineus*, que vem demonstrado potencial na indução de resistência para o controle de diversas doenças de plantas.

Di Piero & Pascholati (2004) verificaram o efeito indutor de resistência pelo uso de extrato aquoso de basidiocarpos de *Agaricus blazei* em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*.

Di Piero et al. (2006) verificaram que o fracionamento com sulfato de amônia do extrato bruto de *Lentinula edodes*, foi capaz de isolar proteínas indutoras de peroxidases, as quais apresentaram redução na severidade de antracnose em plântulas de pepino.

Fiori-Tutida (2003), estudando o uso de extratos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *A. blazei* na indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana*, concluiu que os extratos brutos de basidiocarpos desses fungos possuem atividade eliciadora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja.

2.8. O FUNGO *Pycnoporus sanguineus*

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

P. sanguineus é uma espécie cosmopolita muito chamativa por sua cor vermelho-alaranjado (RAISMAN & GONZALEZ, 2008). É um fungo do tipo saprófita de crescimento lento, pertencente a Divisão Basidiomycota, da família Poliporaceae. Este fungo tem basidiocarpo duro e lenhoso, geralmente encontrado em troncos em processo de apodrecimento. São encontrados ao longo dos trópicos e podem apresentar benefícios medicinais significantes (JUNGLE, 2008). *P. sanguineus* possui componentes para o tratamento de reumatismos, artrites e gota (NATURAL, 2008).

A atividade antimicrobiana de *P. sanguineus* é conhecida desde 1946, quando Bose (1946) isolou poliporina, um composto ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sem toxicidade para animais (ROSA et al., 2003). Smânia et al. (1998) demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica a partir de um composto de pigmento alaranjado isolado desse fungo, denominado cinnabarina, o qual possui uso na medicina popular no tratamento de várias doenças infecciosas, demonstrando

atividade biológica contra espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e diversos membros do gênero *Streptococcus*, entre outros (SMÂNIA et al., 1995). Há, porém, grande variação nas atividades biológicas entre diferentes isolados desse fungo (ROSA et al., 2003).

Dessoay (2003) realizando levantamento sobre a incidência de *P. sanguineus* na região centro Oeste do Rio Grande do Sul e análise de seus metabólitos secundários, observou a presença de cumarinas, flavonóides, esteróides e terpenóides no fungo em estudo, além de não haver diferenças qualitativas entre os extratos analisados quanto aos metabólitos secundários presentes.

Assi (2006), estudando o efeito da aplicação de extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* contra *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro concluiu que houve o controle da antracnose e que o mesmo pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios do patógeno, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases. Baldo (2008) obteve resultados semelhantes para o mesmo patossistema, observando ainda a capacidade de indução de fenilalanina amônia-liase, β -1,3 glucanase e espécies reativas de oxigênio.

Viecelli (2008), estudando o efeito da aplicação de extratos de *P. sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola* em feijoeiro, concluiu que os extratos controlam a mancha angular através de atividade antimicrobiana sobre o patógeno e indução da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, de forma localizada e sistêmica.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja (*Glycine max* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v. 2, p. 642-664, 1997.

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

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

BERTRAND, J.P.; LAURENT, C.; LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo: HUCITEC: Editora da Universidade de São Paulo, 1987.

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

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

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.305-346.

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

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CARNEIRO, C.E.A.; ROLIM, H.M.V.; FERNANDES, K.F. Estudo das atividades de peroxidase e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de

diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá, v.25, n.1, p.189-193, 2003.

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. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 4. p.81-124.

DESSOY, E.C.M. **Incidência e análise fitoquímica de *Pycnopus sanguineus* na região de Sntiago/RS**. In: 54^a Reunião Nacional de Botânica. Belém – PA, 2003. Disponível em: <<http://www.adaltech.com.br/>>. Acesso: 27 de julho de 2008.

DI PIERO, R.M.; WULFF N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 175-180, 2006.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na inibição entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n.1, 2004.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Paraná – 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 217p.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná 2000/01**. Londrina: Embrapa Soja. 2000.

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 à *Bipolaris sorokiniana***. Maringá, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM – Universidade Estadual de Maringá.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 21 de nov. de 2008.

JUNGLE Photos. Disponível em: <<http://www.junglephotos.com/>> Acesso: 30 de julho de 2008.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**. v.46, p.636-641. 1997.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.387-410.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v.18, p.193-215, 1987.

MÉTRAUX, J-P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. cap.1, p.7-24.

NATURAL-list. Disponível em: <<http://www.naturallist.com/medmushr.htm>>. Acesso em: 30 de julho de 2008.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**. v.107, p.19-28. 1992.

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

OKOT-KOTBER, M.; LIAVOGA, A.; YONG, K.J.; BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2410-2417, 2002.

PANG, Z.; KANG, Y-N; BAN, M.; ODA, M; KOBAYASHI, R.; OHNISHI, M.; MIKAMI, B. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3- β -glucanase from *Arthrobacter* sp. **Acta Crystallographica**, v.61, p.68-70, 2004.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.417-452.

PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI? In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.115-116, 2003.

RESENDE, M.L.V. Aspectos moleculares envolvendo o fenômeno de indução de resistência . In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**. V.29, n.1, p.129, 2003.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL. Cruz alta – RS, 2002. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2002/2003**. Cruz Alta: FUNDACEP/FECOTRIGO, 2002, 140 p.

ROESSING, A.C.; LAZZAROTTO, J.J. Documentos 233 – Criação de empregos pelo complexo agroindustrial da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 50p.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência de plantas a patógenos. Viçosa, UFV. **Cadernos Didáticos**, n.56, 1999.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.967-974, 2003.

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SINCLAIR, J.B., HARTMAN, G.L. Management of soybean rust workshop. Urbana: **College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences**, p. 6-10.1995.

SMÂNIA, E. de F. A. ; SMANIA JUNIOR, A. ; LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4, p.317-320, 1998.

SMÂNIA, A.; DELLE MONADHE, F.; 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**. v.45, p.177-181, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal**. Metabólitos secundários e defesa vegetal. Porto Alegre: Artmed, 3^a ed., 2004. cap.13, p.309-334.

TOILLIER, S.L. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

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.

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

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

YORINORI, J.T.; LAZZAROTTO, J.J. Documentos 236 – **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27p.

4 CAPÍTULO I – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA, EM COTILÉDONES DE SOJA, POR FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL A PARTIR DE BASIDIOCARPOS DE *P. sanguineus*

RESUMO

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A aplicação de extratos brutos visando à indução de mecanismos de resistência é uma alternativa interessante ao controle químico, entretanto, nestes extratos podem ocorrer além da presença de indutores, a presença de supressores. Este trabalho teve por objetivo a purificação parcial, através de cromatografia de filtração em gel, de compostos presentes em extrato bruto de basidiocarpos *P. sanguineus* eficientes na indução de mecanismos de defesa em cotilédones de soja. Extrato bruto de *P. sanguineus* foi submetido à cromatografia de filtração em gel (CFG), sendo obtidos cinco picos protéicos e um pico glícido, com pesos moleculares variando de 1,82 à 5,18 KDa. Cotilédones de soja incisados foram tratados com as frações provenientes da CFG, além do extrato bruto a 20% (EB 20%), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e água, totalizando nove tratamentos. Após incubação por um período de 20 h, efetuou-se avaliação dos teores de fitoalexinas, peroxidases, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase (FAL). O tratamento EB 20% mostrou-se eficiente na indução de fitoalexinas, sendo semelhante a *S. cerevisiae*, reconhecidamente indutora de gliceolinas. A atividade de peroxidases foi inibida pelo EB 20%, e apesar de não diferirem estatisticamente da testemunha água, os demais tratamentos mostraram atividades maiores que a mesma, com destaque para fração glícida, seguida das frações protéicas III (3,44 Kda) e V (1,82 Kda). A atividade de polifenoloxidasas apresentou tendência semelhante à enzima peroxidase, porém as frações obtidas por CFG não foram tão eficientes na indução de polifenoloxidasas como foram para peroxidases. A atividade de β -1,3 glucanases foi induzida pela fração protéica IV (2,79 KDa) que apresentou atividade 222,5% maior que a testemunha água. A atividade da FAL foi induzida pelos picos protéicos III e V. De acordo com os resultados obtidos pôde-se selecionar as frações protéicas III, IV e V, além da fração de carboidratos como potenciais indutores de resistência em soja.

Palavras chaves: indução de resistência, cromatografia de filtração em gel, *Pycnoporus sanguineus*, gliceolina.

**INDUCTION OF PHYTOALEXINS AND PLANT DEFENSE RELATED PROTEINS IN
SOYBEAN COTYLEDONS TREATED WITH GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY
FRACTIONS OBTAINED FROM *Pycnoporus sanguineus* BASIDIOCARPS**

ABSTRACT

Induced resistance involves the activation of latent defense mechanisms in plants in response to the treatment with biotic or abiotic agents. The use of crude extracts aimed at inducing resistance mechanisms is an interesting alternative to chemical control, however, in this extracts can occurs besides de presence of inducers, the presence of suppressors. This work objectived a partial purification, through gel filtration chromatography, of compounds in basidiocarps crude extracts from *Pycnoporus sanguineus* efficient in the induction of defense mechanisms in soybean cotyledons. Crude extracts from *P. sanguineus* were submitted to gel filtration chromatography (GFC), and five proteins and one carbohydrate peaks were obtained, with molecular weight ranging from 1,82 to 5,18 KDa. Incised soybean cotyledons were treated with the fractions from GFC, crude extract 20% (CE), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) and water, entering nine treatments. After incubation, for 20 h, was realized evaluation of phytoalexins content and peroxidases, polyphenoloxidases, β -1,3 glucanases and phenylalanine ammonia-lyase activities. The treatment CE 20% was efficient on phytoalexins induction, similar to *S. cerevisiae*, glyceolin inductor pattern. The peroxidase activity was inhibited for EB 20%, and although not statistically different from water, the other treatments showed higher activity, with emphasis on carbohydrate fraction, followed by protein fractions III (3,44 Kda) and V(1,82 Kda). This indicates the presence of suppressors in CE. The polyphenoloxidase activity tended to be similar the peroxidase, however the fractions obtained by GFC were not so efficient in the induction of polyphenoloxidases as peroxidases. The β -1,3 glucanases activity was induced by protein fraction IV that showed activity 222.5% higher than the water. Phenylalanine ammonia-lyase was largely induced by protein peaks III and V. According to the results, it was possible to select the protein peaks III, IV (2,79 KDa) and V, in addition to the carbohydrate peak, as potential inducers of resistance in soybean.

Key words: resistance induced, gel filtration chromatography, *Pycnoporus sanguineus*, glyceolin.

4.1 INTRODUÇÃO

Na natureza, a resistência é regra e a suscetibilidade exceção. Portanto, só ocorre doença quando há uma interação compatível entre hospedeiro e patógeno. No caso de uma interação incompatível, há o reconhecimento planta-patógeno, e a ativação de mecanismos de defesa contra o invasor (KUNOH, 2008).

O fenômeno de reconhecimento ocorre devido a presença de uma molécula elicitora no patógeno bem como de um receptor na planta. A natureza dessas moléculas elicitoras é variável, sendo comuns proteínas, glicoproteínas, carboidratos e lipídios. A origem dessas moléculas também é variável, podendo ser de origem biótica (DI PIERO et al. 2004; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007) ou abiótica (HIJWEGWN et al., 1996; COQUOZ et al., 1995; COOLS & ISHII, 2002).

Muitos desses elicitores já foram parcialmente purificados a partir de extratos brutos de diferentes naturezas, como a partir de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* (GUZZO & MORAES, 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (BONALDO & PASCHOLATI, 2007) e *Lentinula edodes* (DI PIERO, et al., 2006).

Moléculas elicitoras desencadeiam um fenômeno conhecido como indução de resistência, que consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta. A proteção das plantas contra fitopatógenos, através da resistência induzida, exhibe vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural de proteção; transmissão por enxertia; e presença do potencial genético para resistência nas plantas suscetíveis (PASCHOLATI, 2003).

Vários trabalhos relatam a capacidade de extratos de basidiocarpos em induzir mecanismos de defesa em plantas cultivadas contra diversos patógenos (DI PIERO, 2003; FIORI-TUTIDA, 2003), além da capacidade indutora de *Pycnoporus sanguineus* (ASSI, 2005; BALDO, 2008; TOILLIER, 2008; VIECELLI, 2008).

A atividade de derivados de *P. sanguineus* como elicitor em soja foi verificada por Peiter-Beninca et al. (2008), que utilizaram extratos metanólico, hexânico e diclorometânico de basidiocarpos desse fungo para induzir a síntese da fitoalexina

gliceolina em soja. Isto demonstra, portanto, o potencial de tratamentos a base de *P. sanguineus* para controle de doenças nessa cultura, como por exemplo, da ferrugem asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi*. Este é considerado, atualmente, o principal patógeno da soja, cujo controle é fortemente dependente da aplicação de fungicidas (GODOY & FLAUSINO, 2008), o que onera o custo de produção, além de possíveis danos ao ambiente, à saúde humana e a seleção de populações do fungo resistentes às moléculas fungicidas (GHINI & KIMATI, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo obter através de cromatografia de filtração em gel, compostos presentes em extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* eficientes na indução de mecanismos de defesa em cotilédones de soja, incluindo a fitoalexina gliceolina e as proteínas peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase, buscando selecionar frações potencialmente eficientes no controle de ferrugem asiática nesta cultura.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do extrato bruto de *P. sanguineus*

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, no período de setembro a dezembro de 2007. Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados de troncos em decomposição na primavera de 2007 em Marechal Cândido Rondon/PR, secos em estufa a 40° C por 2 h e moídos em moinho de faca. Para obtenção do extrato bruto foi utilizado pó seco de basidiocarpos de *P. sanguineus* hidratado por 24 h a 4°C em água estéril, na proporção de 14 mL para cada grama de pó (DI PIERO, 2003). Após esse período a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1, e em seguida em microfiltrado com membrana de 0,22 μ m de diâmetro de poro. A solução extraída foi denominada extrato bruto (EB) e armazenada a 4° C até o momento de uso, não ultrapassando sete dias de armazenamento.

4.2.2 Cromatografia de filtração em gel (CFG)

Para a execução da cromatografia de filtração em gel, utilizou-se uma coluna de vidro (1 cm x 60 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), formando um gel sedimentado. Aplicou-se 1 mL do EB sobre o leito da coluna e eluiu-se com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, sendo coletadas frações de 1 mL, num fluxo de 1 mL min⁻¹. Efetuou-se o monitoramento da presença de proteínas das frações obtidas em espectrofotômetro a 280 nm. A presença de carboidratos foi monitorada como descrito por Lever (1972). As frações nas quais ocorreram a presença de proteínas e/ou carboidratos foram reunidas de acordo com o perfil de eluição e testadas em ensaios para avaliar a capacidade de indução de enzimas relacionadas a defesa em cotilédones de soja.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada utilizando-se uma curva de calibração. A curva foi construída plotando-se em um gráfico o logarítmo das massas moleculares das proteínas padrão e o quociente do volume de eluição destas proteínas, pelo “void volume” (V_e/V_o) (FIORI-TUTIDA, 2003).

4.2.3 Determinação da indução de fitoalexinas e enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja

O ensaio para determinar a capacidade de indução das frações purificadas a partir de *P. sanguineus*, contou com cinco picos protéicos, com massas moleculares de 5,18; 3,87; 3,44; 2,79 e 1,82 kDa, e um de carboidratos, obtidos a partir da CFG, além de EB 20%, *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e água. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. *S. cerevisiae* foi utilizado como tratamento padrão para síntese de gliceolina (LABANCA, 2002).

Sementes de soja do cultivar CD 215 (MEINERZ et al., 2007) foram semeadas em areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação. Após dez dias, os cotilédones foram destacados das plantas, lavados em água destilada, enxugados e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície

inferior. Para cada repetição, cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre cada cotilédone aplicou-se uma alíquota de 40 µL do tratamento. As placas foram mantidas a 25 °C e escuro por 20 h.

4.2.3.1 Determinação de fitoalexinas

Os cotilédones incisados e tratados foram transferidos para frascos de filme fotográfico contendo 15 mL de água destilada estéril e deixados em agitação por 1 h para extração das fitoalexinas formadas (FRANZENER, 2002). A absorbância da solução foi determinada a 285 nm (ZEIGLER & PONTZEN, 1982). Cada tratamento foi constituído de quatro placas (repetições) contendo cinco cotilédones cada uma.

4.2.3.2 Determinação de enzimas relacionadas à defesa

4.2.3.2.1 Obtenção da preparação enzimática

Os cotilédones tratados, provenientes da determinação de fitoalexinas, foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado. O homogeneizado foi centrifugado a 6.000 g durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a 4 °C para posteriores análises bioquímicas.

4.2.3.2.2 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 2,8 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio p.a.,

12,5 mL de guaiacol 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,2 mL de preparação enzimática. A cubeta de referência continha 3 mL do substrato para enzima. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, pelo período de 2 min. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.3.2.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidases foi determinada pela metodologia descrita por Dungmal e Apenten (1999). O substrato para enzima consistiu de 110,1 mg de catecol diluído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0), formado uma solução de catecol 0,02 M. A reação ocorreu a 30 °C, pela adição de 20 μL da preparação enzimática em 980 μL do substrato para enzima e posterior acompanhamento em espectrofotômetro a 420 nm, pelo método direto, durante 2 min. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.3.2.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL da preparação enzimática foram acrescidos de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40 °C durante 2 h. Ao final desse período adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se de leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato protéico e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorbância

a 290 nm e x a concentração de ác. *trans*-cinâmico (μg) e expressa em mg de ácido *trans*-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.3.2.5 Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELSANG & BARZ, 1993). A reação envolveu 100 μL da preparação enzimática, 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) e 150 μL de laminarina (2 mg mL^{-1}), que foi a 40 °C durante 1 h. O controle passou pelo mesmo processo, porém a adição de laminarina foi feita somente após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 μL da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 0,5% (HAPH) (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100 °C durante 10 min, resfriada, e determinada a absorvância a 410 nm. A atividade de β -1,3-glucanases consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle, a qual foi plotada em curva padrão para glicose ($y = 0,002x + 0,0046$, onde y é a absorvância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (μg) e expressa em equivalente mg de glicose $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.3.2.6 Atividade de quitinases

A atividade de quitinases foi determinada pela adição de 200 μL de CM-Chitin-RBV, sob agitação, à solução com 50 μL da preparação enzimática e 750 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5). A mistura foi incubada por 20 min a 40 °C, após esse período as amostras foram acidificadas com 200 μL de HCl 1 M, resfriadas por 10 min em gelo e centrifugadas a 9500 g por 6 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. O controle consistiu de 800 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5) e

200 μL de CM-Chitin-RBV (Wirth & Wolf, 1990). A atividade de quitinase foi determinada pela diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e a do controle, assumindo-se o valor de uma unidade de enzima para cada unidade de incremento na absorbância, sendo expressa em unidades de enzima $\text{min}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

4.2.3.2.7 Determina\u00e7\u00e3o de prote\u00ednas totais

O teor de prote\u00ednas totais foi determinado pelo m\u00e9todo de Bradford (1976), consistindo de 600 μL de tamp\u00e3o fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 μL de prepara\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica e 200 μL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de \u00e1cido fosf\u00f3rico (H_3PO_4) e 125 mL de \u00e1gua destilada). Ap\u00f3s adicionar o reagente sob agita\u00e7\u00e3o e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofot\u00f4metro a 595 nm. Cada amostra foi formada por quatro r\u00e9plicas. A cubeta de refer\u00eancia consistiu de 800 μL de tamp\u00e3o fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μL de reagente. A absorb\u00e2ncia foi plotada em curva padr\u00e3o para prote\u00edna ($y = 0,0299x + 0,0596$, onde y \u00e9 a absorb\u00e2ncia a 595 nm e x a concentra\u00e7\u00e3o de prote\u00edna (μg)). As atividades enzim\u00e1ticas foram relacionadas aos teores de prote\u00ednas totais.

4.2.4 An\u00e1lise dos resultados

Os dados foram submetidos a an\u00e1lise de vari\u00e2ncia e aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) quando pertinente. O programa utilizado para an\u00e1lise estat\u00edstica foi o software livre Sisvar (Vers\u00e3o 5.0).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Purificação parcial através de cromatografia de filtração em gel (CFG)

Pela cromatografia de filtração em gel obtiveram-se cinco picos protéicos e um pico glicídico (Figura 4.1 e Tabela 4.1), cujas massas moleculares variaram de 1,82 a 5,18 KDa.

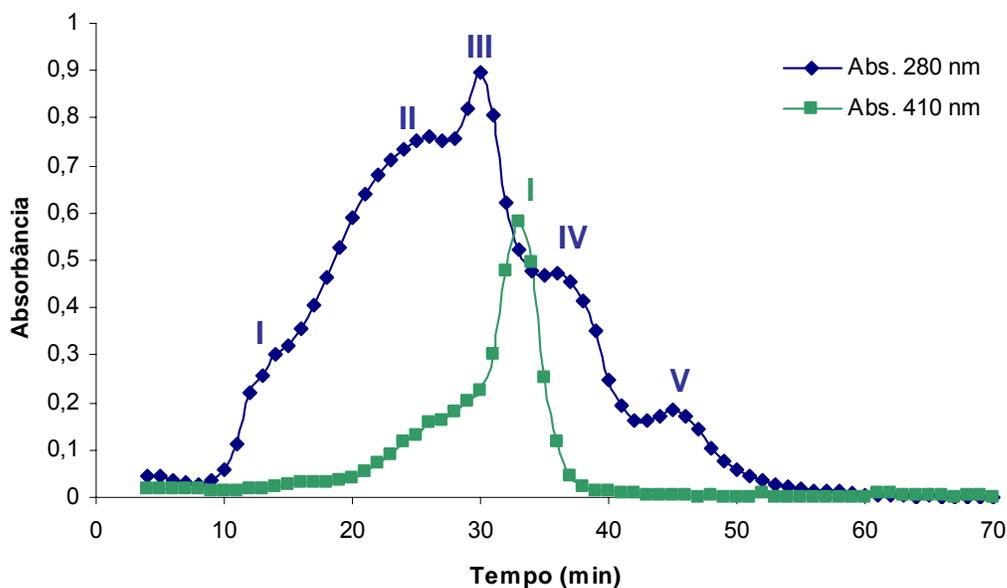


Figura 4.1 Cromatografia de filtração em gel obtida a partir de extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* aplicado em coluna de vidro (1 cm x 60 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), e eluído com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, sendo coletadas frações de 1 mL, num fluxo de 1 mL min⁻¹.

Fiori-Tutida (2003), realizando cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de filtração em gel de extratos brutos de dois isolados de *Lentinula edodes*, obteve 23 picos protéicos para o isolado LE 96/17 e 15 picos para o isolado LE 95/01, comprovando a eficiência do método na purificação dos extratos aquosos de basidiocarpos desse fungo.

Tabela 4.1 Massa molecular (Mm) de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus*.

| Frações protéicas da CFG | Mm (KDa)* |
|--------------------------|-----------|
| I | 5,18 |
| II | 3,87 |
| III | 3,44 |
| IV | 2,79 |
| V | 1,82 |

* Massa molecular obtida de acordo com a curva de calibração representada pela Figura 1 (Apêndice).

Di Piero (2003), trabalhando com extrato aquoso de *L. edodes*, obteve eficiência quanto à purificação parcial por cromatografia de troca iônica, obtendo seis picos protéicos a partir da fração precipitada com saturação de 40-80% de sulfato de amônio.

4.3.2 Indução de fitoalexinas

Na Figura 2 são apresentados os dados de indução da síntese de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, cultivar CD 215. Observa-se que os tratamentos EB 20% e *S. cerevisiae* mostraram-se superiores aos demais, apresentando superioridade de 326,5% e 400%, respectivamente, em relação à testemunha água.

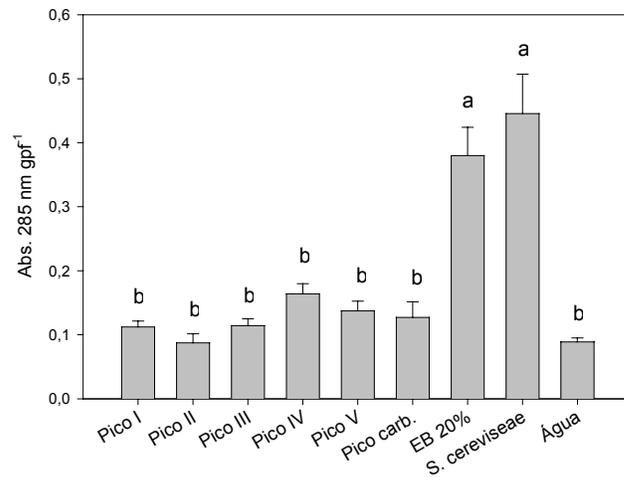


Figura 4.2 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 30,82. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glicídica; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Pazuch et al. (2007), trabalhando com extratos de *P. sanguineus*, observaram o potencial indutor de fitoalexinas em sorgo tanto pelo filtrado de meio de cultura líquido, como pelos extratos de micélio e basidiocarpos, sendo em média mais que 60% superiores em relação à testemunha água.

Meinerz et al. (2007), buscando avaliar o potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*, testaram as concentrações 1, 5, 10, 15 e 20% e verificaram que houve incremento linear na síntese de fitoalexinas com o aumento na concentração do extrato. Tal incremento foi superior em até 236% a testemunha água.

Fiori-Tutida (2003), estudando a capacidade de indução de fitoalexinas em sorgo e soja tratados por frações parcialmente purificadas por cromatografia de troca iônica, e sequencialmente, cromatografia de filtração em gel de extrato bruto de *L. edodes*, obteve indução de deoxiantocianidinas pela maior parte das 23 frações obtidas do isolado LE 96/17, com destaque para frações com massas moleculares identificadas como 25; 1,3; 26 e 75 kDa. Por outro lado, as mesmas frações não foram capazes de induzir gliceolinas, com exceção para uma fração (1,0 kDa). Da mesma forma que para o isolado LE 96/17, o autor procedeu a purificação parcial do extrato bruto do isolado

95/01 e obteve indução de deoxiantocianidinas para 11 das 15 frações obtidas, destacando-se as frações com massas moleculares de: 80; 2; 1,4 e 1 kDa. Gliceolinas não foram induzidas por estas frações.

Guzzo & Moraes (1997), buscando a purificação e caracterização parcial de um elicitor de fitoalexina em soja a partir de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*, obtiveram um elicitor purificado por precipitação etanólica fracionada, seguida por cromatografias de afinidade, troca iônica e exclusão. Os resultados evidenciaram que o elicitor é um polissacarídeo, constituído principalmente por manose (88,8%), glicose (6,7%) e galactose (4,5%).

4.3.3 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases mostrou-se superior para todos os demais tratamentos em relação ao EB 20%, não diferindo, porém da testemunha água (Figura 4.3). Isso indica a provável presença de supressores no EB. Apesar da ausência de diferença estatística o pico glícido mostrou-se 46,9% superior a água, seguido dos picos V (1,82 KDa) e III (3,44 KDa), com superioridade de 43,3% e 40,5% respectivamente em relação a testemunha.

Di Piero (2003), buscando avaliar a atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas por cromatografia de troca aniônica de extrato aquoso de *L. edodes*, obteve elevação na atividade de peroxidases por dois picos obtidos (III e V), porém apenas o pico V foi capaz de proteger plântulas de pepino contra antracnose.

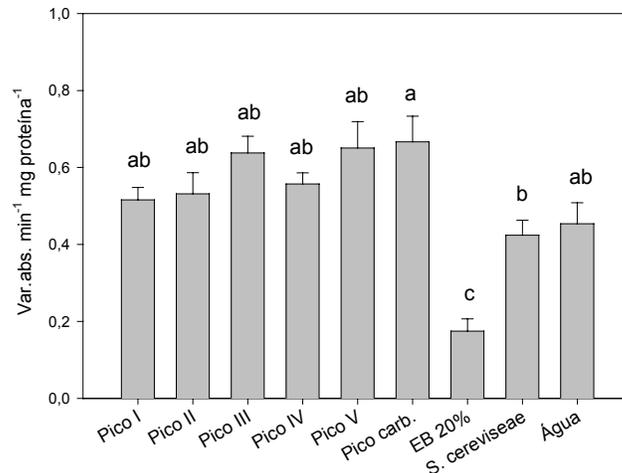


Figura 4.3 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de peroxidases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 19,05. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glicídica; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Meinerz et al. (2007), buscando avaliar o potencial indutor de peroxidases de extratos de *P. sanguineus* a 1, 5, 10, 15 e 20% em cotilédones de soja, observaram que a atividade enzimática teve comportamento quadrático com maior valor observado na concentração 5%, onde ocorreu incremento de 41% em relação a testemunha água.

Peiter-Beninca et al. (2008), avaliando a indução de peroxidases, verificaram que 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 acibenzolar-S-metil (ASM), e em soja a atividade foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferir do tratamento com ASM.

Baldo (2008), verificou indução de peroxidases pelo tratamento com filtrado de meio líquido, extratos de micélio e basidiocarpo de *P. sanguineus* em plantas de feijão inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, estando ligada à redução da doença antracnose. Já, Fiori-Tutida (2003), não verificou indução na atividade de peroxidases em plantas de trigo tratadas com extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* e inoculadas com *Bipolaris sorlokiniana*.

4.3.4 Atividade de polifenoloxidasas

Houve uma maior atividade de polifenoloxidasas (Figura 4.4) para a fração glúcida em relação ao EB 20% e picos I (5,18 KDa) e II (3,88 KDa). Observa-se uma redução na atividade de polifenoloxidasas de 56,9% para o EB 20% em relação à água. A fração glúcida mostrou-se 44,2% superior à testemunha. A exemplo do que foi observado para a atividade de peroxidases, neste caso pode-se também supor uma possível presença de inibidores enzimáticos no EB devido a baixa atividade para este tratamento. Apesar de os tratamentos pico protéico III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V (1,82 KDa), além da fração glúcida, apresentarem uma maior atividade comparados aos demais tratamentos, os mesmos mostraram-se estatisticamente semelhantes à testemunha água.

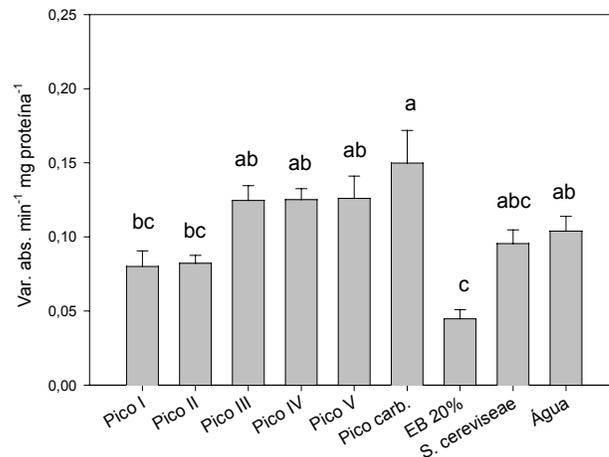


Figura 4.4 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 22,58. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Dados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Meinerz et al. (2007), que avaliando o potencial indutor de polifenoloxidasas por extratos de *P. sanguineus* em diferentes concentrações (1, 5, 10, 15 e 20%) em cotilédones de soja, observaram decréscimo linear na atividade com o aumento na concentração do extrato, com redução de 22% da atividade na concentração de 20%.

Baldo (2008), estudando a indução de polifenoloxidasas em plantas de feijão tratadas com extratos aquosos de *P. sanguineus*, não verificou incrementos significativos na atividade específica de polifenoloxidasas, sendo ainda, que o tratamento basidiocarpo a 10% reduziu a mesma em 37% em relação à testemunha água.

Viecelli (2008) verificou induções e inibições na atividade de polifenoloxidasas em plantas de feijão tratadas com extratos de *P. sanguineus* e inoculadas com *Pseudocercospora griseola*, não havendo correlação clara entre tratamentos e severidade da doença.

4.3.5 Atividade de β -1,3 glucanases

Na Figura 4.5 são apresentados os dados de atividade de β -1,3 glucanases. Observa-se uma maior atividade para o pico protéico IV, a qual foi estatisticamente superior ao pico protéico V, EB 20%, *S. cerevisiae* e à testemunha água, não diferindo, porém, dos demais tratamentos. O pico IV (2,79 KDa), fração glúcida e o pico II (3,87 KDa) apresentaram atividade enzimática 222,5%, 144,3% e 128% superiores a testemunha água, respectivamente.

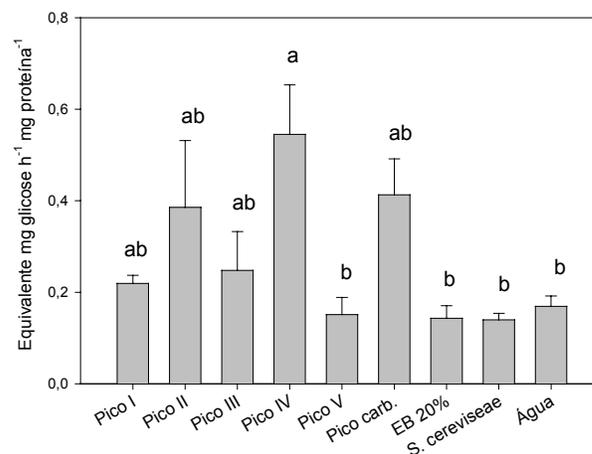


Figura 4.5 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 47,90. Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glúcida; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Fiori-Tutida (2003), estudando a influência da aplicação de extratos de *A. blazei* e *L. edodes* na atividade de β -1,3 glucanases em plantas de trigo inoculadas com *Bipolaris sorokiniana*, verificou a capacidade indutora de *A. blazei*, sendo que o mesmo não foi verificado para *L. edodes*.

Fiori-Suzuki (2008) verificaram aumento na 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%.

Baldo (2008), trabalhando com extratos de *P. sanguineus* na indução de resistência em feijão contra *C. lindemuthianum*, observou incrementos na atividade de β -1,3 glucanases pelos tratamentos filtrado de meio líquido a 5% e extrato de micélio a 10%, porém, não houve relação entre o padrão de atividade enzimática e a redução na severidade de antracnose.

4.3.6 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (Figura 4.6) mostrou-se superior para o tratamento pico protéico V (1,82 KDa), não diferindo estatisticamente apenas do pico protéico III (3,44 KDa). Os demais tratamentos mostraram-se semelhantes à testemunha água.

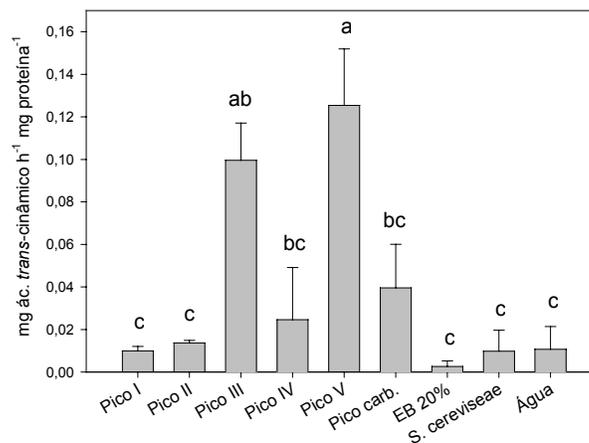


Figura 4.6 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. CV% = 73,07. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Picos I a V: frações protéicas; Pico carb.: fração glicídica; EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%; *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Baldo (2008) observou expressiva atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijão tratadas com extratos de *P. sanguineus* e inoculadas com *C. lindemuthianum*, chegando a apresentar atividade até 76% maior que a testemunha água.

Kuhn (2007) observou que em feijoeiros tratados com *Bacillus cereus* e ASM, a atividade de fenilalanina não foi alterada em função dos indutores. Segundo o autor, isso 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.

4.4 CONCLUSÃO

Foi possível, através de cromatografia de filtração em gel, purificar parcialmente compostos elicitores a partir de extrato bruto de *P. sanguineus*, capazes de induzir atividade de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja, cultivar CD 215, sendo os mais efetivos os picos protéicos III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V (1,82 KDa), além da fração glúcida.

Os tratamentos obtidos pela purificação parcial do extrato bruto de *P. sanguineus* por CFG, picos protéicos I (5,18 kDa), II (3,87 kDa), III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V (1,82 KDa), além da fração glúcida, não foram efetivos em induzir a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja CD 215.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*.** Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

BONALDO, S.M; PASCHOLATI, S.F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, 2007.

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

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. p.305-346.

COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL 1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.273-282, 2002.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.85, p.1219-1224, 1995.

DI PIERO, R.M.; WULFF N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 175-180, 2006.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n.1, 2004.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá**

e tomate, e a purificação parcial dos compostos biologicamente ativos. Piracicaba, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

FIORI-SUZUKI, C.C.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BONALDO, S.M.; ITAKO, A.T.; TOLENTINO JUNIOR, J.B. Ativação de enzima glucanase em folhas de plantas de maracujazeiro tratadas com extratos de cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. **Summa Phytopathologica**, v. 32 (suplemento), 2008.

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 à *Bipolaris sorokiniana*.** Maringá, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM – Universidade Estadual de Maringá.

FRANZENER, G. **Atividade antifúngica, produção de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* a partir da planta medicinal *Artemisia camphorata* (cânfora).** Marechal Cândido Rondon, 2002. 28 p. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Agronomia). UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GODOY, C.V. & FLAUSINO, A.M. **Eiciência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja em Londrina e Tamarana, PR, na safra 2007/08.** Londrina: Embrapa Soja, 2008.

GUZZO, S.D.; MORAES, W.B.C. Purificação e caracterização parcial de um elicitor de fitoalexina em soja, a partir de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, 1997.

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

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

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

Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

KUNOH, H. Aspectos celulares das interações planta-patógeno. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v.13, p. 153-175.

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

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.

MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; FRANZENER, G.; IURKIV, L.; BRAGA, C.L.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *Pycnopus sanguineus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), p.S304, 2007.

PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI? In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.115-116, 2003.

PAZUCH, D.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; IURKIV, L.; SIRTOLI, L.F.; KUHN, O.J. Produção de fitoalexinas em sorgo pelo tratamento com *Pycnopus sanguineus* – Efeito da dose. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), 2007.

PEITER-BENINCA, C.; FRANZENER, G.; ASSI, L. IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A., STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.3, p.189-196, 2007.

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

TOILLIER, S.L. Controle de crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

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

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a b-1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v. 189, p.60–69, 1993.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

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

5. CAPÍTULO II – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM SOJA POR FRAÇÕES OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA A PARTIR DE BASIDIOCARPOS DE *Pycnopus sanguineus*

RESUMO

A indução de resistência, que consiste no aumento do nível de resistência pela ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta e sem qualquer alteração em seu genoma, é desencadeada por moléculas elicitoras que podem ser de origem biótica ou abiótica. A utilização de extratos brutos de basidiocarpos vem demonstrado eficiência satisfatória na indução de mecanismos de defesa e controle de doenças em inúmeros patossistemas. Entretanto, a utilização dos mesmos pode não apresentar resultados satisfatórios devido à heterogeneidade de compostos presentes, muitos deles supressores de mecanismos de resistência. Este trabalho teve por objetivo a purificação parcial, por meio de precipitação com sulfato de amônio (SA), de compostos presentes em extrato bruto de *Pycnopus sanguineus*, capazes de induzir a síntese de fitoalexinas e a atividade de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja. Foi efetuada a precipitação fracionada das proteínas presentes em 100 mL de extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*. As frações obtidas foram: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% de SA. Cotilédones de soja incisados foram tratados com as frações precipitadas, além dos tratamentos extrato bruto a 20% (EB 20%), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e água. Após incubação pelo período de 20 h efetuou-se análises bioquímicas dos cotilédones para verificar os teores de fitoalexinas, e a atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase. O tratamento EB 20% mostrou-se eficiente na indução da síntese de fitoalexinas, sendo superior até mesmo a *S. cerevisiae*, reconhecido indutor de gliceolinas. A atividade de peroxidases foi menor para o EB 20% apesar do mesmo não diferir estatisticamente dos demais tratamentos, apenas de *S. cerevisiae*. A atividade de polifenoloxidase mostrou-se inferior apenas para o precipitado 0-20% em relação ao EB 20% e *S. cerevisiae*, indicando a presença de um supressor naquela fração. Para β -1,3 glucanases observou-se maior atividade para a fração 60-80% em relação à fração 0-20%, sendo que o EB 20% e a testemunha água apresentaram valores intermediários entre as duas frações. Isso indica a provável presença de indutores na fração 60-80% e inibidores na 0-20%. Apesar de ausência de diferença estatística, para a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase houve maior atividade para os tratamentos EB 20% e *S. cerevisiae*, enquanto a fração 0-20% apresentou novamente característica supressora. De acordo com os resultados obtidos pôde-se selecionar as frações 40-60%, 60-80% e 80-100% como potenciais indutores de resistência em soja.

Palavras chaves: indução de resistência, precipitação fracionada por sulfato de amônio, *Pycnopus sanguineus*, gliceolina.

**INDUCTION OF PHYTOALEXINS AND PLANT DEFENSE RELATED PROTEINS IN
SOYBEAN TREATED WITH AMMONIUM SULPHATE PRECIPITATED OBTAINED
FROM *Pycnoporus sanguineus* BASIDIOCARPS**

ABSTRACT

The induced resistance that is the increase of the level of resistance by activation of latent defense mechanisms in the plant and without any change in its genome, is triggered by elicitor molecules that can be biotic or abiotic. The use of mushrooms fruiting bodies extracts has been showing satisfactory performance in the induction of plant defense mechanisms and disease control in many pathosystems. However, the use of them can not show satisfactory results due the heterogeneity of these compounds, many suppressors of resistance mechanisms. This work aimed the partial purification, by ammonium sulphate precipitation, of compounds present in crude extract from *Pycnoporus sanguineus*, capable of inducing phytoalexins and enzymes defense related in soybean cotyledons. It was made the fractionated protein purification from 100 mL of crude extract from *P. sanguineus*. The fractions obtained were: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100% of ammonium sulphate. Incised soybean cotyledons were treated with precipitated fractions, crude extract 20% (EB 20%), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) and water. After incubation during 20 h, was made biochemical analyses to verify the phytoalexins content and peroxidases, polyphenoloxidases, β -1,3 glucanases and phenylalanine ammonia-lyase activities. The EB 20% was efficient in the phytoalexins induction, better than *S. cerevisiae*, recognized glyceolins inductor. The peroxidase activity was lower to EB 20%, but statistically similar to the other treatments, except to *S. cerevisiae*. The polyphenoloxidases activity was lower to the precipitated 0-20% than EB 20% and *S. cerevisiae*, indicating the presence of suppressor in that fraction. For β -1,3 glucanases was observed higher activity for the fraction 60-80% than 0-20%, being that EB 20% and water presented values intermediary between both fractions. This indicates the probably presence of inducers at fraction 60-80% and inhibitors at 0-20%. Although the absence of statistical difference, for the enzyme phenylalanine ammonia-lyase there was increased activity for EB 20% and *S. cerevisiae*, while the fraction 0-20% presented suppressor feature again. According to the results it was possible to select the fractions 40-60%, 60-80% and 80-100% as potential resistance inducers in soybean.

Key words: resistance induction, ammonium sulfate precipitation, *Pycnoporus sanguineus*, glyceolin.

5.1 INTRODUÇÃO

A indução de resistência, que consiste no aumento do nível de resistência pela ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta e sem qualquer alteração em seu genoma (ROMEIRO, 2008), é desencadeada por moléculas elicitoras que podem ser de origem biótica (DI PIERO et al. 2004; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007) ou abiótica (HIJWEGWN et al., 1996; COQUOZ et al., 1995; COOLS & ISHII, 2002). Essa resposta é devido ao reconhecimento por parte da planta de um elicitor, presente em patógenos cuja interação com determinada espécie ou variedade é não compatível ou mesmo consistindo de moléculas de diferentes origens.

A ativação de mecanismos de resistência pode ocorrer pela indução da síntese de fitoalexinas, atividade de enzimas relacionadas à defesa, como peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases, β -1,3 glucanases, lignificação, formação de papilas e halos, entre outros (ROMEIRO, 2008).

A aplicação de extratos brutos de plantas medicinais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003) e microrganismos (KUHN, 2007; ASSI, 2005, BALDO, 2008) já foi testada quanto à capacidade elicitora e comprovada para inúmeros patossistemas, sendo efetivos no controle de várias doenças. Dentre estes destaca-se a utilização de extratos brutos de *Pycnopus sanguineus* no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (ASSI, 2005, BALDO, 2008), *Pseudocercospora griseola* (VIECELLI, 2008) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (TOILLIER, 2008) em feijoeiro.

A atividade de derivados de *P. sanguineus* como elicitor em soja foi verificada por Peiter-Beninca et al. (2008), que utilizaram extratos metanólico, hexânico e diclorometânico de basidiocarpos desse fungo para induzir a síntese da fitoalexina gliceolina em soja. Isto demonstra, portanto, o potencial de tratamentos a base de *P. sanguineus* para controle de doenças nessa cultura, como por exemplo, da ferrugem asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi*. Este é considerado, atualmente, o principal patógeno da soja, cujo controle é fortemente dependente da aplicação de fungicidas (GODOY & FLAUSINO, 2008), o que onera o custo de produção, além de possíveis danos ao ambiente, à saúde humana e a seleção de populações do fungo resistentes às moléculas fungicidas (GHINI & KIMATI, 2000).

A purificação parcial de compostos presentes em extratos brutos consiste numa forma prática de obter frações com características indutoras e com potencial para o desenvolvimento de produtos específicos altamente indutores. No presente trabalho, buscou-se a purificação parcial, por meio de precipitação com sulfato de amônio, de compostos presentes em extrato bruto de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, capazes de induzir a produção da fitoalexina gliceolina e a atividade das enzimas relacionadas à defesa peroxidases, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja, buscando selecionar frações potencialmente eficientes no controle de ferrugem asiática nesta cultura.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do extrato bruto de *P. sanguineus*

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, no período de setembro a dezembro de 2007. Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados de troncos em decomposição na primavera de 2007 em Marechal Cândido Rondon/PR, secos em estufa a 40° C por 2 h e moídos em moinho de faca. Para obtenção do extrato bruto foi utilizado pó seco de basidiocarpos de *P. sanguineus* hidratado por 24 h a 4°C em água estéril, na proporção de 14 mL para cada grama de pó (DI PIERO, 2003). Após esse período a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1, e em seguida em microfiltrado com membrana de 0,22 μ m de diâmetro de poro. A solução extraída foi denominada extrato bruto (EB) e armazenada a 4° C até o momento de uso, não ultrapassando sete dias de armazenamento.

5.2.2 Precipitação fracionada do extrato de basidiocarpo de *P. sanguineus*

As proteínas presentes em 100 mL do extrato bruto de basidiocarpos foram precipitadas em sulfato de amônio em saturações de 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100% (DI PIERO, 2003). O sal foi dissolvido gradativamente, sob agitação, com a solução mantida a 10 °C. Após a dissolução do sal, a solução foi centrifugada a 5.000 g por 35 min. As proteínas presentes em cada fração foram ressuspensas em 3,5 mL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e efetuada diálise contra água destilada (4 °C, 24 h, com três trocas) em membrana com limite de exclusão de 20.000 Da. O volume final foi ajustado para 7 mL.

5.2.3 Determinação da indução de fitoalexinas e enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja

O ensaio para determinação da indução de síntese de fitoalexinas e atividade de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja contou com cinco cortes obtidos pela precipitação do extrato bruto de *P. sanguineus* com sulfato de amônio, além de EB 20% (diluição com água destilada do EB obtido conforme descrito anteriormente), *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e água. *S. cerevisiae* foi utilizado como tratamento padrão para síntese de gliceolina (LABANCA, 2002).

Sementes de soja do cultivar CD 215 (MEINERZ et al., 2007) foram semeadas em bandejas contendo areia esterilizada e mantidas em laboratório à temperatura ambiente. Após dez dias, os cotilédones foram destacados das plantas, lavados em água destilada, enxugados e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Para cada repetição, cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre cada cotilédone aplicou-se uma alíquota de 40 µL do tratamento. As placas foram mantidas a 25 °C e escuro por 20 h.

A determinação de fitoalexinas foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.1. As atividades de peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônialiase e β -1,3 glucanases foram determinadas conforme descrito no ítem 4.2.3.2.

5.2.4 Análise dos resultados

Os dados foram submetidos a análise de variância e aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) quando pertinente. O programa utilizado para análise estatística foi o software livre Sisvar (Versão 5.0).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Indução de fitoalexinas

A indução de síntese de fitoalexinas (Figura 5.1) mostrou-se superior para o tratamento EB 20% em relação aos demais, alcançando indução 106,1% maior que o tratamento *S. cerevisiae* (25 mg mL⁻¹), reconhecidamente indutor de fitoalexinas em soja (LABANCA, 2002). Porém, não houve indução por parte dos tratamentos obtidos a partir da precipitação com sulfato de amônio.

Peiter-Beninca et al. (2008), trabalhando com extratos hexânico, etanólico e diclorometânico de *P. sanguineus*, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto à indução de síntese de fitoalexianas em cotilédones de soja. Entretanto, houve efetividade dos tratamentos extrato hexânico a 750 mg L⁻¹ e extrato etanólico a 100 mg L⁻¹ de *P. sanguineus* em mesocótilos de sorgo, proporcionando valores de absorbância estatisticamente superiores ao da testemunha água.

Fiori-Tutida (2003), trabalhando com extratos brutos de basidiocarpos de diferentes isolados de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, observou indução de fitoalexinas em sorgo e soja. Gliceolinas foram induzidas pelo extrato bruto dos isolados

LE 95/01 e LE 96/17 de *L. edodes* na concentração 40.000 ppm, enquanto o extrato bruto dos isolados ABL 29/99 (BA) e ABL 29/99 (BF) de *A. blazei* foi capaz de induzir gliceolinas em todas as concentrações utilizadas (100, 1.000, 10.000, 20.000 e 40.000 mg L⁻¹).

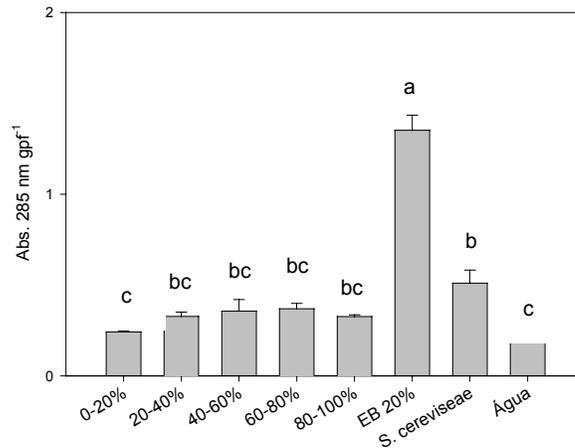


Figura 5.1. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fitoalexinas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 20,96. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Piccinin (2000), trabalhando com filtrados aquosos de basidiocarpo, píleo, estipe e micélio do cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake), verificou a ação elicitora desses tratamentos na produção de fitoalexinas do complexo das deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolinas em soja, porém, constatou maior acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo do que em cotilédones de soja.

Meinerz et al. (2007), trabalhando com extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* em diferentes concentrações (1, 5, 10, 15 e 20%), observaram incremento linear na síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja com o aumento na concentração do extrato de *P. sanguineus*, chegando a valor 236% superior à testemunha água.

5.3.2 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases foi superior somente para o tratamento *S. cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) em relação aos tratamentos fração precipitada com sulfato de amônia a 0-20% e EB 20%, não diferindo, porém, da testemunha água. Apesar da ausência de diferença estatística, a fração 0-20% apresentou redução de 26,7% e EB 20% apresentou redução de 30,5%, ambos em relação à testemunha água. Através destes dados pode-se supor uma possível presença de inibidores de peroxidases nestas frações.

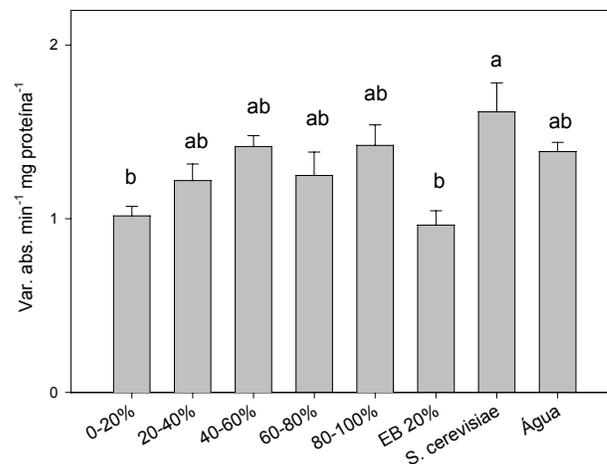


Figura 5.2. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de peroxidases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 16,12. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Di Piero (2003) obteve indução de peroxidases em cotilédones de pepino pela aplicação de precipitado de *L. edodes* relativo à saturação de 40-80% com sulfato de amônio, sendo tal tratamento capaz de conferir proteção a plântulas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*.

Peiter-Beninca et al. (2008) não observaram incremento significativo na atividade de peroxidases em mesocótilos de sorgo tratados com extratos hexânico, etanólico e diclorometânico de *P. sanguineus*, entretanto, com relação à atividade específica de

peroxidases em cotilédones de soja, observou-se, com o extrato diclorometânico na concentração de 250 mg L^{-1} , uma superação em relação ao tratamento com acibenzolar-S-metil (200 mg L^{-1} do produto comercial) em 30%. Para o extrato hexânico houve incremento na atividade de peroxidases, com ajuste para equação de 2º grau e pico de atividade na concentração de 500 mg L^{-1} . O tratamento com extrato etanólico demonstrou uma inibição da atividade de peroxidase proporcional ao aumento da concentração utilizada.

Testando a atividade indutora de resistência de extratos aquosos de *P. sanguineus* em diferentes concentrações, Meinerz et al. (2007) observaram comportamento quadrático na atividade de peroxidases em cotilédones de soja, com maior valor observado na concentração 5%, onde ocorreu incremento de 41% em relação a testemunha água.

Assi (2005), trabalhando com extrato de *P. sanguineus* no controle de *Colletotrichum lindmuthianum* e indução de peroxidases em feijoeiro, obteve indução local e sistêmica na atividade dessa enzima, sendo observado incremento na atividade local principalmente para EB 20%, três dias após o tratamento.

5.3.3 Atividade de polifenoloxidasas

Para a atividade de polifenoloxidasas (Figura 5.3) os tratamentos *S. cerevisiae* (25 mg mL^{-1}) e EB 20% apresentaram maior indução, entretanto, estatisticamente superiores apenas a fração 0-20% de sulfato de amônia. A inibição de 53,5% na atividade de polifenoloxidasas para a fração 0-20% em relação a testemunha água, indica a provável presença de inibidores dessa enzima nesta fração. Meinerz et al. (2007), buscando avaliar o potencial indutor de resistência de extratos aquosos de *P. sanguineus* em cotilédones de soja, encontraram resultados diferentes aos obtidos neste trabalho, com decréscimo linear na atividade dessa enzima com aumento na concentração do extrato, com redução de 22% na atividade para a concentração de 20% do EB em relação à testemunha água.

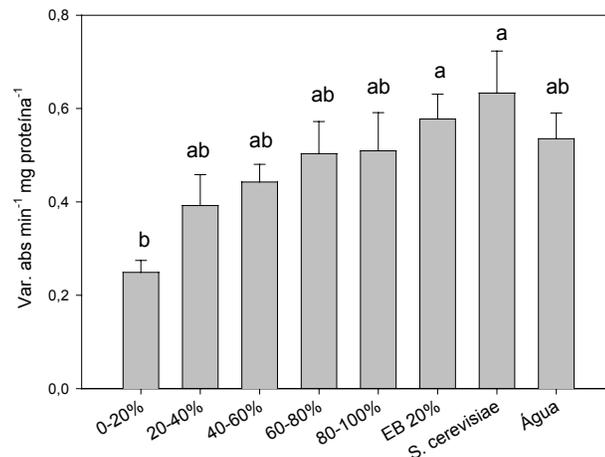


Figura 5.3. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 26,24. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Silva et al. (2008), estudando a indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*, observaram que plantas tratadas com o isolado Abl-28 de *A. blazei* e não inoculadas apresentaram atividade de polifenoloxidasas superior à testemunha água 12 dias após o tratamento. Quando as plantas foram tratadas e inoculadas apenas o isolado Abl-11 de *A. blazei* mostrou-se superior à testemunha por volta do sétimo dia após o tratamento.

Em tomateiro, Silva et al. (2007) obtiveram indução na atividade de polifenoloxidasas pelo isolado Abl-26 de *A. blazei* no terceiro dia após o tratamento em plantas não inoculadas com *R. solanacearum*. O mesmo não foi observado em plantas inoculadas com o patógeno.

5.3.4 Atividade de β -1,3 glucanases

A atividade de β -1,3 glucanases mostrou-se superior para o tratamento com a fração precipitada com 60-80% de sulfato de amônia em relação ao tratamento com a fração 0-20%. Apesar de não apresentar diferença significativa, o tratamento com a fração 60-80% apresentou atividade 88,6% maior em relação ao EB 20%, enquanto o

tratamento Corte 0-20% apresentou atividade 35% menor em relação ao mesmo tratamento. Estes dados indicam a presença de indutores e inibidores de β -1,3 glucanases no EB de *P. sanguineus* e a eficiência da precipitação com SA na purificação parcial destas frações.

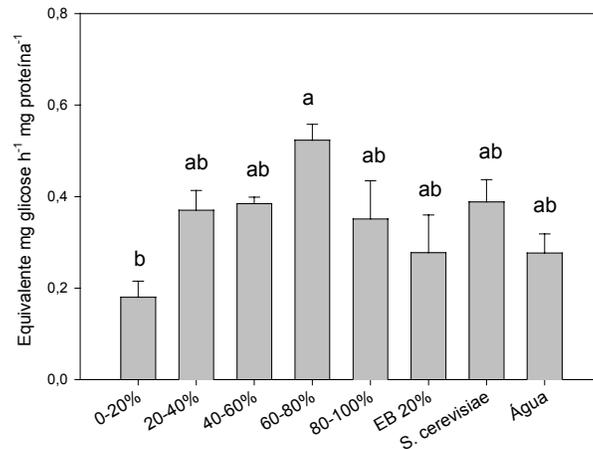


Figura 5.4. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 26,58. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Kuhn (2007), avaliando a ativação de mecanismos de resistência em feijão tratado com suspensão de células de *Bacillus cereus* e acibenzolar-S-metil (ASM), observou ativação de β -1,3 glucanases somente para a aplicação de ASM, enquanto *B. cereus* não se mostrou eficiente na indução desta enzima.

Osswald et al (2004), estudando o patossistema sorgo – *Colletotrichum graminicola*, observaram que apesar da indução na produção de fitoalexinas ser diretamente proporcional ao aumento na dose de ASM, ocorreu uma redução na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

5.3.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase

Para a atividade de fenilalanina amônia-liase, apesar da ausência de diferença estatística entre os tratamentos, houve uma superioridade de 48% e 33,7% dos tratamentos *S. cerevisiae* (25 mg mL⁻¹) e EB 20%, respectivamente, em relação à testemunha água. Além de uma redução em 49,6% da atividade desta enzima para o tratamento com a fração 0-20% em relação à testemunha.

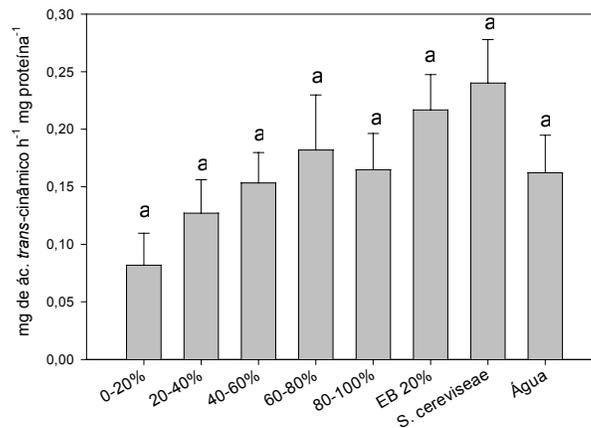


Figura 5.5. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de *Pycnoporus sanguineus* na atividade de fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja. Barras representam \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV% = 35,04. Colunas 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EB 20%: extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20%. *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg produto comercial mL⁻¹).

Silva et al. (2008), investigando a indução de enzimas relacionadas à defesa em plantas de berinjela por *L. edodes* e *A. blazei* contra *R. solanacearum*, observaram aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase pela aplicação de extrato aquoso do isolado Abl-11 de *A. blazei* no 7º e 12º dias após o tratamento em plantas inoculadas com o patógeno.

Silva et al (2007), trabalhando com o patossistema tomateiro - *R. solanacearum*, obtiveram incremento na atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas não inoculadas no 3º, 7º e 12º dias após o tratamento com extrato aquoso de *L. edodes* e *A.*

blazei, enquanto plantas inoculadas e tratadas apresentaram menor atividade desta enzima em relação a testemunha água.

5.4 CONCLUSÃO

Foi possível, através de precipitação com sulfato de amônio, purificar parcialmente compostos elicitores a partir de extrato bruto de *P. sanguineus*, capazes de induzir atividade de enzimas relacionadas à defesa em cotilédones de soja, cultivar CD 215, sendo as mais efetivas as frações 40-60%, 60-80%, 80-100%.

O EB 20% foi efetivo na indução da síntese de gliceolinas, entretanto, os tratamentos obtidos pela purificação parcial do extrato bruto de *P. sanguineus* por precipitação com SA, cortes 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, não apresentaram eficiência na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja CD 215.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemutianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib. na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.)** Marechal Cândido Rondon, 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*.** Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL 1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.273-282, 2002.
- COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.85, p.1219-1224, 1995.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n.1, 2004.
- 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 à *Bipolaris sorokiniana*.** Maringá, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM – Universidade Estadual de Maringá.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
- GODOY, C.V. & FLAUSINO, A.M. **Eiciência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja em Londrina e Tamarana, PR, na safra 2007/08.** Londrina: Embrapa Soja, 2008.
- HIJWEGWN, T.; VERHAAR, M.A.; ZADOKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dicloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v.45, p.631-635, 1996.
- KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em

Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; FRANZENER, G.; IURKIV, L.; BRAGA, C.L.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *Pycnopus sanguineus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), p.S304, 2007.

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

PEITER-BENINCA, C.; FRANZENER, G.; ASSI, L. IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A., STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

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

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v.13, p. 411-431.

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, p.554-556, 2003.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.137-144, 2008.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**.

Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

TOILLIER, S.L. **Controle de crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus***. Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

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

**6. CAPÍTULO III – CONTROLE DE FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA PELA
UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES PARCIALMENTE PURIFICADAS POR
CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL E PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE
AMÔNIA DE *Pycnopus sanguineus***

RESUMO

A doença ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das mais importantes da cultura da soja. O controle é feito basicamente pela aplicação de fungicidas, entretanto, o alto custo e o impacto ambiental causado por esse método estimula a busca por alternativas de controle. A indução de resistência consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta pela aplicação de elicitores de origem biótica ou abiótica. A aplicação de extratos brutos de basidiocarpos tem demonstrado eficiência para controle de doenças de plantas, porém, muitos deles apresentam compostos supressores, o que reduz seu efeito, pela inibição de alguns mecanismos de defesa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de frações parcialmente purificadas de basidiocarpos de *Pycnopus sanguineus* no controle de ferrugem asiática em soja por indução de resistência. A partir de ensaios preliminares selecionou-se oito tratamentos com potencial indutor de fitoalexinas e enzimas relacionadas à defesa em soja: frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V (1,82 KDa), e glúcida, obtidas por cromatografia de filtração em gel; frações de 40-60%, 60-80% e 80-100%, obtidas por precipitação com sulfato de amônio; extrato bruto (EB) de basidiocarpo de *P. sanguineus*, além das testemunhas fungicida Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹) e água. Foi realizado ensaio *in vitro* visando avaliar a atividade antimicrobiana dos tratamentos sobre *Phakopsora pachyrhizi* através da inibição da germinação de uredósporos do patógeno. Visando avaliar o controle de ferrugem asiática e indução da atividade de enzimas relacionadas a defesa em plantas tratadas com as frações purificadas, conduziu-se ensaio em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, onde plantas foram tratadas e após três dias inoculadas com o patógeno. Amostras foram coletadas 0, 1, 3, 6 e 9 dias após os tratamentos para análises bioquímicas e a severidade foi avaliada após 13 dias. Os dados referentes à avaliação de atividade antimicrobiana mostrou que as frações não possuem atividade inibidora da geminação de esporos. Quanto à severidade, a fração protéica III obtida por CFG e o EB 20% foram eficientes na redução do número de lesões por cm². Para peroxidases, o EB 20% apresentou tendência em reduzir a atividade enzimática. A atividade das enzimas quitinases e polifenoloxidasas não foi afetada pelos tratamentos. Para β -1,3 glucanases houve indução local pelas frações glúcida e protéicas III e V, e pelas frações 40-60% e 60-80% em relação ao EB 20%, sendo que o mesmo apresentou indução sistêmica para essa enzima. Para fenilalanina amônia-liase as frações purificadas de *P. sanguineus* apresentaram tendência em reduzir a atividade enzimática, com exceção para EB 20%. Os dados referentes ao teor de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, indicam inibição por parte das frações parcialmente purificadas sobre a síntese desses

pigmentos. Foi possível induzir mecanismos de defesa em soja contra *P. pachyrhizi* pela aplicação de frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus*, o que pode permitir o desenvolvimento de métodos alternativos para controle desse patógeno no cultivo da soja.

Palavras chaves: indução de resistência, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pycnopus sanguineus*.

**CONTROL OF SOYBEAN ASIAN RUST USING *Pycnopus sanguineus*
DERIVATED FRACTIONS OBTAINED BY GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY
AND AMMONIUM SULPHATE PRECIPITATION**

ABSTRACT

The Asian rust disease, caused by *Phakopsora pachyrhizi*, is one of most important of soybean culture. The control is made basically with fungicides, however the damages to environment caused by this method encourage the search for new alternatives of control. The induction of resistance consists of the activation of latent mechanisms of plant defense for the use of biotic or abiotic elicitors. Extracts of basidiocarps has been demonstrating efficiency for the control of plant diseases, however, the presence of suppressor compounds, can reduces ets effect, inhibiting the activation of some mechanisms of defense. The aim of this work was to evaluate the efficiency of partially purified fractions from *Pycnopus sanguineus* to the control of Asian rust in soybean by induction of resistance. From preliminary tests eight treatments were selected with potential inductor of phytoalexins and defense related enzymes in soybean: protein III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) and V (1,82 KDa), and glicidic fraction, obtained by gel filtration chromatography, fractions 40-60%, 60-80% and 80-100%, obtained by ammonium sulphate precipitation, crude extract (CE) of basidiocarps at 20%, besides control treatments fungicide (tebuconazole, 0,5 g a.i. L⁻¹) and water. It was made in vitro assays to evaluate the antimicrobial activity of the treatments with *Phakopsora pachyrhizi* through the inhibition of the uredospores germination. Aiming evaluating the control of the Asian rust disease and induction of defense related enzymes in soybean treated with the purified fractions, was conduced an assay in greenhouse where the plants were treated three days before the inoculation with the pathogen. Samples were collected 0, 1, 3, 6 and 9 days after the treatment for biochemical analyses and the severity was evaluated after 13 days. The data referring to evaluation of antimicrobial activity show that the fractions do not have inhibiting activity of germination of spores. As for severity, the treatments protein fraction III and CE 20% were efficient in the reduction of the number of injuries for cm². For peroxidase the CE 20% presented tendency in reducing the enzymatic activity. Chitinases and polifenoloxidasas did not presented statistical differences between the treatments. For β -1,3 glucanases there was local induction for the treatments with glicide fraction and protein fractions III and V, and fractions 40-60% and 60-80%, while CE 20% presented systemic induction for this enzyme. For phenylalanine ammonia-lyase the purified fractions of *P. sanguineus* reduced the enzymatic activity, except for CE 20%. The chorophylls and carotenoids content was inhibited for same fractions. It was possible to induce defense mechanisms in soybean against *P. pachyrhizi* for the application of partially purified fractions from *P. sanguineus*, indicating its possible use as an alternative method for controlling this pathogen.

Palavras chaves: induction of resistance, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pycnopus sanguineus*.

6.1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das culturas mais produzidas no Brasil, e, portanto de valor econômico e social expressivo. O país está entre os principais produtores mundiais do grão, cuja produção na safra 2007/2008 chegou a 58 milhões de toneladas (IBGE, 2008). Apesar da alta produção nacional, a sojicultura enfrenta problemas fitossanitários de grande expressão, sendo um dos principais a ferrugem asiática (EMBRAPA, 2006).

Ferrugem asiática é causada por *Phakopsora pachyrhizi*, um fungo biotrófico que adaptou-se muito bem as condições ambientais do Brasil. Desde sua constatação, esta doença vem causando severas epidemias, gerando perdas significativas na produção (GODOY & FLAUSINO, 2008). A aplicação de fungicidas é o principal método de controle utilizado, principalmente pela eficiência e praticidade (GODOY & CANTERI, 2004). No entanto, controle contínuo baseado neste método ocasiona grande impacto ambiental, destacando-se a contaminação do produto e do ambiente por resíduos, além da seleção de populações do patógeno resistentes aos princípios ativos (GHINI E KIMATI, 2000). Neste sentido, a indução de resistência torna-se uma alternativa promissora no controle de fitopatógenos (ROMEIRO, 2008).

A indução de resistência, definida como aumento do nível de resistência pela ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta (ROMEIRO, 2008), apresenta vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural de proteção; transmissão por enxertia; e presença do potencial genético para resistência nas plantas suscetíveis (PASCHOLATI, 2003).

Inúmeros compostos de origem biótica (DI PIERO et al. 2004; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007) ou abiótica (HIJWEGWN et al., 1996; COQUOZ et al., 1995; COOLS & ISHII, 2002) já foram testados em diferentes patossistemas, sendo efetivos no controle de diversas doenças e apresentaram resultados satisfatórios, induzindo diferentes mecanismos de defesa, entre eles PR-Proteínas, fitoalexinas e lignificação, entre outros (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Destaca-se a utilização de extratos brutos de *Pycnoporus sanguineus* no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (ASSI, 2005, BALDO, 2008), *Pseudocercospora griseola* (VIECELLI, 2008) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (TOILLIER, 2008) em feijoeiro.

A utilização de extratos brutos, no entanto, nem sempre apresenta bons resultados. Isso se deve em grande parte, à heterogeneidade de compostos presentes em um mesmo extrato, alguns deles, com características inibitórias. Dessa forma, a purificação parcial de compostos presentes em extratos brutos torna-se uma ferramenta importante no estudo da indução de resistência por estes extratos (DI PIERO, et al., 2006; FIORI-TUTIDA, 2003; WULFF & PASCHOLATI, 1999).

O presente trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de frações parcialmente purificadas de basidiocarpos de *P. sanguineus*, por cromatografia de filtração em gel e precipitação com sulfato de amônio, previamente selecionadas de acordo com o potencial indutor de síntese de fitoalexinas e indução da atividade de enzimas relacionadas à defesa, no controle de ferrugem asiática em soja, cultivar CD 215.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Localização do experimento

Os ensaios referentes à utilização das frações, selecionadas na primeira fase do projeto, no controle de ferrugem asiática em soja foram realizados no período de 18 de fevereiro a 14 de março de 2008 no Centro de Pesquisa em Soja, pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizado na cidade de Londrina – PR.

6.2.2 Atividade antimicrobiana contra *Phakopsora pachyrhizi*

A atividade antimicrobiana foi avaliada microscopicamente através da inibição da germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi*. Os esporos do fungo foram obtidos de plantas de soja doadoras de inóculo, mantidas em casa-de-vegetação.

Para o teste de inibição de germinação de esporos, uma alíquota de 50 µL da suspensão de esporos (1×10^4 uredósporos/mL) e outra de 50 µL dos tratamentos selecionados: quatro provenientes da CFG (frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa), V (1,82 KDa) e glúcida) e três da precipitação com SA (cortes 40-60%, 60-80% e 80-100%), além do EB 20%, fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹) e água, foram aplicados sobre placa de Petri contendo uma fina camada de ágar-água 1%. Essas placas foram incubadas a 23°C em escuro, sendo a porcentagem de germinação determinada após 18h, através da contagem do número de esporos germinados e não germinados após o emprego de azul algodão de lactofenol (para paralisar a germinação) e observação ao microscópio óptico. Cada tratamento foi composto de quatro repetições, cada uma representada por uma placa de Petri.

6.2.3 Utilização de frações provenientes da CFG e da precipitação com sulfato de amônio no controle de ferrugem asiática

Para testar a efetividade da indução de resistência das frações selecionadas provenientes da CFG e da precipitação com SA, foi conduzido experimento em casa-de-vegetação objetivando avaliar a evolução da doença e análises bioquímicas em plantas de soja tratadas com tais frações. A temperatura foi mantida entre 23 a 27° C e a UR em 100% durante o período crítico de infecção. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Os tratamentos foram selecionados a partir dos testes preliminares realizados com cotilédones de soja, sendo quatro provenientes da CFG (frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa), V (1,82 KDa) e glúcida) e três da precipitação com SA (cortes 40-60%, 60-80% e 80-100%), além do EB 20%, fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹) e água. Vasos com capacidade

para 4 L foram preenchidos com substrato composto de solo, composto orgânico e areia, na proporção 2:2:1. O terceiro trifólio das plantas foi tratado por pulverização quando as mesmas se encontravam no estágio V5, e 72 h após o tratamento o terceiro e o quarto trifólios foram inoculados pulverizando-se as folhas com uma suspensão de $0,8 \times 10^5$ uredósporos mL^{-1} do fungo *P. pachyrhizi* (SANTOS et al., 2007). Após a inoculação, as plantas foram nebulizadas durante ciclos de 2 minutos nos horários: 19h (duas horas após a inoculação), 21 h, 22 h, 24 h, 03 h, 06 h e 08 h.

6.2.3.1 Coleta de amostras para análises bioquímicas e fisiológicas

Para as análises bioquímicas foram coletadas três amostras (repetições), em torno de 0,2 g, cada uma proveniente de uma planta, para cada tempo de coleta (0 h, 24 h, 72 h, 6 dias, 9 dias após o tratamento), sendo que o mesmo foi feito para ambas as folhas (tratada e não tratada). As amostras foram pesadas e congeladas para posterior análise.

6.2.3.2 Determinação da atividade de enzimas relacionadas à defesa

A atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase, β 1,3-glucanases, quitinases e determinação de proteínas totais foram realizadas por metodologia descrita em 4.3.2.

6.2.3.3 Determinação de pigmentos fotossintetizantes

A determinação do conteúdo de clorofila a, clorofila b e carotenóides foi feita através de metodologia descrita por Sims & Gamon (2002). Amostras em torno de 0,02 a 0,03 g foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo após, acrescidos 3 mL de uma solução contendo 80% de acetona p.a. e 20% de Tris HCl 0,02M (pH 7,8). A suspensão

foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm (4°C). Realizou-se leitura direta do sobrenadante obtido em espectrofotômetro a 663 nm (clorofila a), 647 nm (clorofila b) e 470 nm (carotenóides). O controle consistiu da solução extratora. A absorvância obtida foi aplicada as seguintes fórmulas:

$$Cl_a = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$Cl_b = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Carot.} = \frac{((A_{470} - (17,1 * (Cl_a + Cl_b) - 9,479 * \text{Antoc.}))}{119,26}$$

Os resultados obtidos (em $\mu\text{mol mL}^{-1}$) foram corrigidos de acordo com os pesos moleculares propostos por Lichtenthaler (1987): $Cl_a = 893.5 \text{ g mol}^{-1}$ $Cl_b = 907.5 \text{ g mol}^{-1}$ e carotenóides totais = 550 g mol^{-1} , e posteriormente expressos em mg gpf^{-1} .

6.2.3.4 Severidade da doença

A severidade foi avaliada 10 dias após a inoculação, quando as plantas apresentavam sintomas visíveis da doença. Foram coletados trifólios tratados e inoculados e trifólios apenas inoculados (terceiro e quarto trifólios, respectivamente), sendo que cada tratamento contou com quatro repetições, cada uma composta por três réplicas. A severidade foi avaliada pela contagem do número de lesões por cm^2 , além do número de urédias por lesão.

6.2.4 Análise dos resultados

Para a análise dos resultados referentes a atividade antimicrobiana e severidade da ferrugem asiática, os dados foram submetidos a análise de variância e aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) quando pertinente.

Em relação às avaliações bioquímicas, utilizou-se esquema fatorial $10 \times 5 \times 2$, sendo dez tratamentos, cinco tempos de coleta e duas folhas (tratada e não tratada), os

dados foram submetidos a análise de variância e aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) quando pertinente.

O programa utilizado para análise estatística foi o software livre Sisvar (Versão 5.0).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Atividade antimicrobiana contra *P. pachyrhizi*

Os dados referentes à inibição da germinação de esporos de *P. pachyrhizi*, são apresentados na Tabela 6.1. Observa-se baixa toxicidade direta das frações, mantendo-se estatisticamente semelhantes à testemunha água, diferindo apenas do fungicida Tebuconazole, o qual apresentou 100% de inibição da germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi*. A atividade não fungitóxica dos tratamentos aponta para uma provável atividade indutora de resistência, sendo este o mecanismo de controle da doença em questão.

Assi (2005), trabalhando com extratos aquosos autoclavados e não autoclavados de *P. sanguineus*, obteve inibição de até 96% na germinação de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum*. Baldo (2008) obteve resultados semelhantes, onde extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% inibiram a germinação de esporos de *C. lindemuthianum* em até 97% e na concentração 1%, apresentou inibição de 34% em relação ao controle água.

Já Viecelli (2008) observou que extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* autoclavados, e basidiocarpo e filtrado de cultura esterilizados por filtração não apresentaram efeito sobre a germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola*, ao passo que o extrato obtido do micélio esterilizado por filtração inibiu a germinação de esporos de acordo com a concentração utilizada.

Di Piero (2003) observou que extratos de basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei* estimularam a germinação *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* e provocaram

aumento no comprimento do tubo germinativo desses esporos em relação aos que germinaram no tratamento controle (água), observou também, a capacidade de alguns isolados em reduzir o crescimento micelial do patógeno, porém, apesar de significativo, o efeito foi pouco pronunciado. Baldo et al. (2008) obtiveram até 78,7% de inibição da germinação de *Phakopsora euvitis* pela aplicação de extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 5%. Sobre *Uromyces appendiculatus* o extrato aquoso a 20% promoveu inibição de 83,7% em relação à testemunha água.

Tabela 6.1. Inibição da germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* por frações parcialmente purificadas de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.

| Tratamentos | Inibição da germinação de esporos (%) |
|--|---------------------------------------|
| Fração protéica III | 2,00 b ¹ |
| Fração protéica IV | 2,25 b |
| Fração protéica V | 1,00 b |
| Fração glúcida | 1,75 b |
| Corte com sulfato de amônia a 40-60% | 2,25 b |
| Corte com sulfato de amônia a 60-80% | 2,25 b |
| Corte com sulfato de amônia a 80-100% | 2,00 b |
| EB ² 20% | 0,50 b |
| Tebuconazole (0,5 g i.a. L ⁻¹) | 100 a |
| Água | 3,75 b |
| CV% | 11,68 |

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade;

²Extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*.

Viecelli (2008) avaliando a inibição no crescimento micelial de *Pseudocercospora griseola*, observou que o extrato obtido do micélio de *P. sanguineus* esterilizado por filtração promoveu redução no crescimento micelial em 100% na maior concentração (20%) quando comparada ao controle água, não diferindo estatisticamente do fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹). As concentrações 5, 10 e 15% também apresentaram alta inibição. O mesmo autor obteve redução significativa na esporulação de *P. griseola* pelo

mesmo tratamento, o qual reduziu em 100% a esporulação a partir da concentração 5%.

Baldo (2008) observou que extratos de micélio, filtrado e basidiocarpo de *P. sanguineus* não foram eficientes na inibição nem indução do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Toillier et al. (2007), testando extratos aquosos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus* no controle in vitro de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, observaram que o extrato do micélio estimulou o crescimento da bactéria de forma dose-dependente, o extrato do filtrado a 20% reduziu em 21% o crescimento bacteriano e o extrato de basidiocarpo a 15 e 20% reduziu 91%, em média, o crescimento bacteriano.

Fiori-Tutida et al. (2007), testando extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, in vitro, observaram que os extratos brutos aquosos de ambos os cogumelos não tiveram efeito significativo tanto no crescimento micelial quanto na germinação de esporos de *B. sorokiniana*. Por outro lado, os extratos dos cogumelos inibiram a germinação de esporos de *P. recondita* f. sp. *tritici*, com destaque para o isolado LE 96/17 de *L. edodes* que apresentou inibição da ordem de 52,4%

Bonaldo & Pascholati (2007), estudando o efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *C. lagenarium*, observaram que frações obtidas por cromatografia de troca iônica eluídas em tampão Tris-HCl induziram a germinação e formação de apressório dos patógenos, enquanto que algumas frações eluídas em tampão bicarbonato de amônio apresentaram efeito estimulante e outras inibitório.

6.3.2 Controle de ferrugem asiática

Os dados de número de lesões de ferrugem asiática por cm² são apresentados na Figura 6.1. Observa-se que a testemunha água apresentou maior número de lesões

por cm^2 em relação aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente apenas da fração protéica III (3,44 KDa), EB 20% e Tebuconazole, para o terceiro trifólio (Figura 6.1. A). Para o quarto trifólio não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 6.1. B).

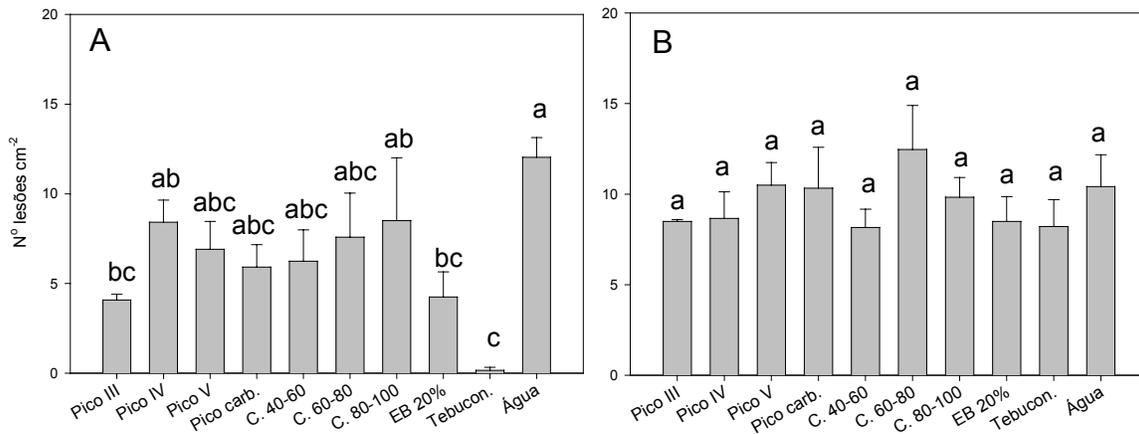


Figura 6.1. Número de lesões de ferrugem asiática por cm^2 em trifólio tratado com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* e inoculado com *Phakopsora pachyrhizi* (A), e em trifólio inoculado (B), de plantas de soja. Barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 41,30. Pico III, IV e V: frações protéicas obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG); Pico carb.: fração com carboidrato obtida por CFG; C. 40-60, C.60-80, C.80-100: frações protéicas obtidas por precipitação com concentração com sulfato de amônia de 40-60, 60-80 e 80-100%, respectivamente; Tebucon: fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹).

Na Figura 6.2 são apresentados os dados referentes ao número de urédias por lesão de ferrugem asiática no terceiro (Figura 6.2. A) e quarto trifólios (Figura 6.2. B). Observa-se que para o terceiro trifólio houve diferença estatística entre a testemunha água e os tratamentos fração protéica III e Tebuconazole. Apesar da ausência de diferença estatística, houve redução média no número urédias por lesão de 46,1% entre os demais tratamentos e a testemunha água. No quarto trifólio observa-se maior número de urédias por lesão para a testemunha água, entretanto, não houve diferença estatística entre esta e os demais tratamentos.

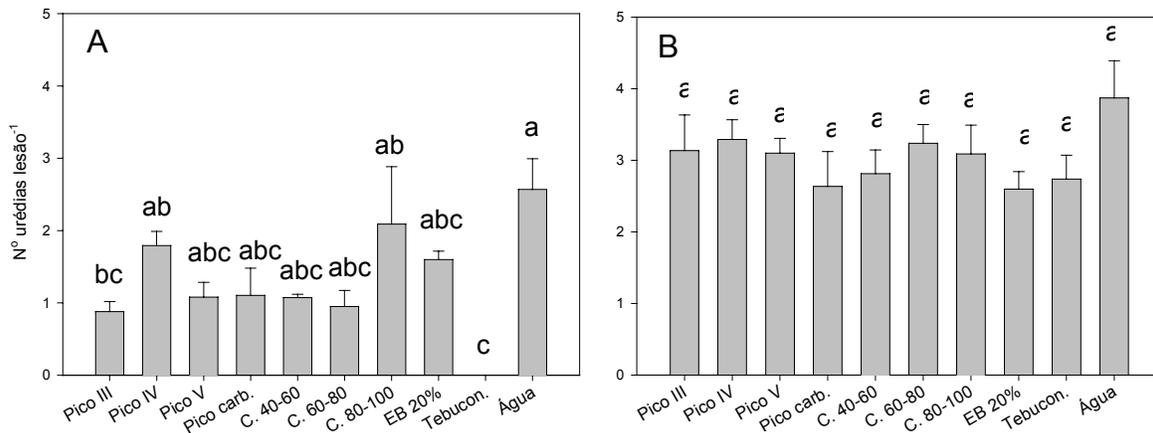


Figura 6.2. Número de urédias de ferrugem asiática por lesão em trifólio tratado com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* e inoculado com *Phakopsora pachyrhizi* (A), e em trifólio inoculado (B), de plantas de soja. Barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 32,33. Pico III, IV e V: frações protéicas obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG); Pico carb.: fração com carboidrato obtida por CFG; C. 40-60, C.60-80, C.80-100: frações protéicas obtidas por precipitação com concentração com sulfato de amônio de 40-60, 60-80 e 80-100%, respectivamente; Tebucon: fungicida tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹).

Assi (2005) obteve controle de até 70% na severidade de antracnose em feijoeiro pela aplicação de extratos aquosos de *P. sanguineus* em folhas tratadas e inoculadas com o patógeno. Em folhas não tratadas e inoculadas a redução média na severidade da doença foi de 63%, indicando uma provável indução sistêmica de resistência pelos tratamentos. Semelhantemente, Baldo (2008) obteve redução média de 57% na severidade de antracnose em folhas de feijoeiro tratado com filtrado de cultura (5 e 10%) e micélio 5% de *P. sanguineus*. Nas folhas não tratadas, apenas inoculadas, também observou-se redução na severidade da doença, chegando a 71% para o extrato de micélio a 5%.

Buscando avaliar a eficiência da aplicação de extratos de *P. sanguineus* no controle de mancha angular em feijoeiro em casa de vegetação, Viecelli (2008), observou redução significativa na severidade da doença no terceiro trifólio (tratado e inoculado), para todos os tratamentos utilizados quando comparados ao controle água, com reduções de até 82,4% na Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o tratamento filtrado de cultura a 10%. Os tratamentos também foram

eficientes na redução da severidade do quarto trifólio, o qual não foi tratado, apenas inoculado com o patógeno. O mesmo autor, realizando experimento a campo, observou reduções de até 63,8% na AACPD para o tratamento basidiocarpo 20% para o mesmo patossistema feijoeiro-*Pseudocercospora griseola*.

Silva et al. (2008) avaliando a efetividade do extrato aquoso de isolados de *A. blazei* e *L. edodes* no controle de murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* em beringela, verificaram que o tratamento com o isolado Abl-28, nas concentrações utilizadas (5, 10, 15 e 20%), foi aquele que promoveu a menor ocorrência de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos. Tratamento com ASM e demais isolados também proporcionaram diminuição na ocorrência de folhas murchas, porém em menor proporção. Silva et al. (2007) em experimento realizado em casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum*, utilizando o indutor acibenzolar-S-metil (ASM) e os extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*, observaram que o extrato aquoso do isolado Le-96/17 a 10% e o ASM proporcionaram menores porcentagens de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos. Estes dois tratamentos reduziram a severidade da murcha bacteriana em 66,00 % e 53,68 % respectivamente, em relação à testemunha tratada com água e inoculada com a bactéria.

Di Piero & Pascholati (2004), testando o efeito dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*, verificaram que de maneira geral, os isolados de *L. edodes* não controlaram a bacteriose. Por outro lado, o isolado ABL 99/28 de *A. blazei* reduziu significativamente a severidade da doença em dois de três testes conduzidos sob condições de casa de vegetação (proteção média na ordem de 45%), quando o extrato de basidiocarpos foi aplicado a 10%, cinco dias antes da inoculação das plantas.

6.3.3 Enzimas relacionadas à defesa

6.3.3.1 Atividade de peroxidases

De modo geral a atividade de peroxidases (Figura 6.3 e 6.4) mostrou-se superior no terceiro trifólio (tratado e inoculado) em relação ao quarto (apenas inoculado), apresentando superioridade de 44,5%, indicando efeito principalmente local dos tratamentos empregados.

Na Figura 6.3 são apresentados os dados referentes à atividade de peroxidases em plantas tratadas com frações obtidas por CFG. Obteve-se diferença estatística no terceiro dia após o tratamento para o terceiro trifólio (Figura 6.3 A), onde o EB 20% mostrou-se inferior a fração protéica V (1,82 KDa), porém não diferindo das testemunhas. No sexto dia após o tratamento (terceiro dia após a inoculação) observa-se diferença estatística entre os tratamentos com frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e V, os quais mostram-se estatisticamente superiores ao tratamento EB 20%. Para o quarto trifólio não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dia de coleta.

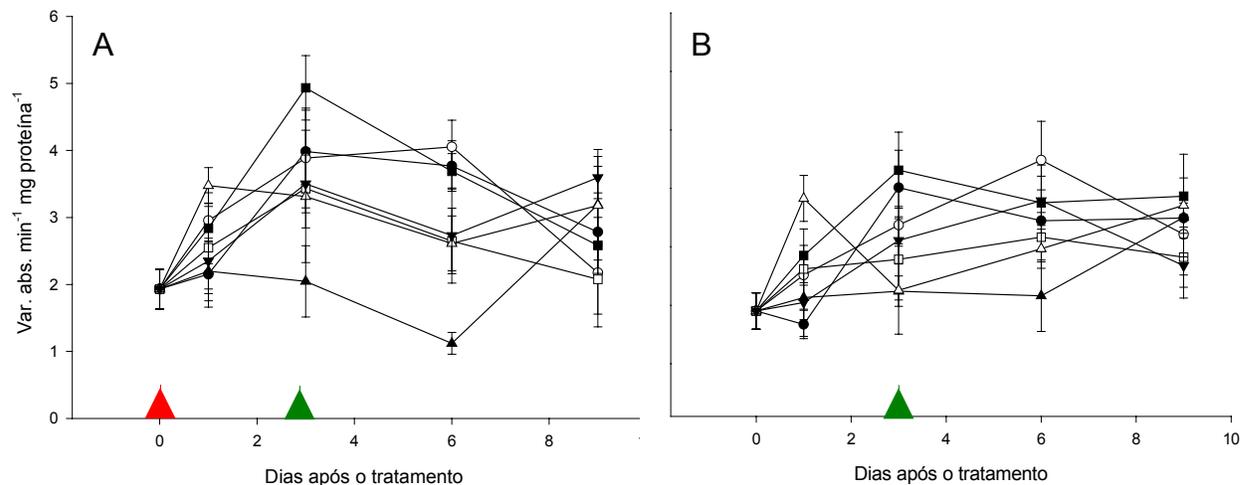


Figura 6.3. Atividade de peroxidases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 36,44. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Na Figura 6.4 observa-se a atividade de peroxidases para os cortes obtidos por precipitação com SA. Obteve-se diferença estatística no terceiro e sexto dias após o tratamento para o terceiro trifólio (Figura 6.4 A), onde o EB 20% mostrou-se inferior ao corte 40-60% em ambos os dias, porém, nenhum diferindo das testemunhas. Para o quarto trifólio (Figura 6.4 B) não houve diferença estatística em nenhum dia de coleta.

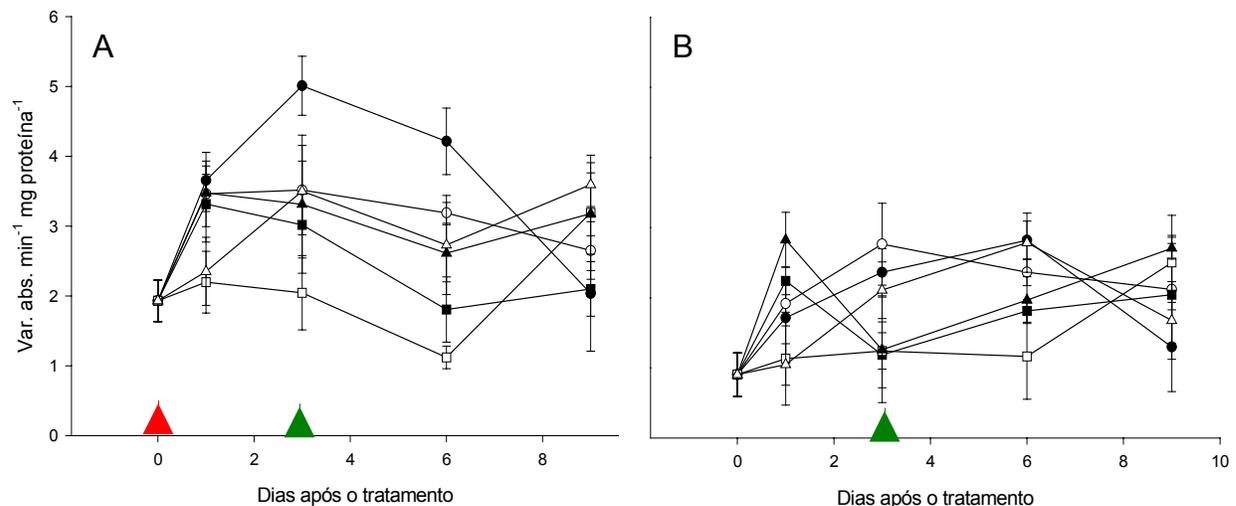


Figura 6.4. Atividade de peroxidases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 36,44. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Resultados diferentes foram obtidos por Assi (2005), o qual verificou incremento significativo na atividade local e sistêmica de peroxidases em plantas de feijão tratadas com extrato aquoso a 20% de basidiocarpos de *P. sanguineus*. Este tratamento foi capaz de reduzir a severidade da doença antracnose em até 70% em folhas tratadas e inoculadas e até 63% em folhas apenas inoculadas, indicando uma possível indução de resistência. Baldo (2008) trabalhando com o mesmo patossistema feijoeiro-*C. lindemuthianum*, observou incrementos na atividade de peroxidases aos três dias após o tratamento para os tratamentos micélio 5%, para o trifólio tratado e inoculado, e

basidiocarpo 10%, para o trifólio apenas inoculado. De acordo com o autor, estes resultados indicam uma possível indução local e sistêmica, tendo em vista a redução na severidade da doença por estes tratamentos.

Resultados obtidos por Viecelli (2008) foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. O autor observou variações na atividade de peroxidases em plantas de feijão tratadas com extratos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* e inoculadas com *Pseuocercospora griseola*. Apesar da ocorrência de aumento na atividade enzimática para alguns dias de amostragem, a tendência foi de inibição na atividade pelos tratamentos, não havendo correlação clara com a severidade de mancha angular.

Di Piero (2003) observou acúmulo local e sistêmico de peroxidases pela aplicação de extrato aquoso de shiitake em plantas de pepino. O acúmulo local foi observado no terceiro e sexto dias após o tratamento, ficando bem evidenciado no nono dia, enquanto o acúmulo sistêmico foi observado somente no 12º dia após o tratamento. Plantas tratadas com shiitake e posteriormente inoculadas com *C. lagenarium* acumularam peroxidases de forma muito semelhante às apenas tratadas. O autor observou relação entre os dados de atividade de peroxidases e severidade da doença, sendo que o tratamento referido reduziu em 60% a severidade em relação a testemunha. O mesmo autor verificou que extrato aquoso de *A. blazei* foi capaz de induzir peroxidases três dias após o tratamento de plantas de tomate, conferindo proteção de até 45% contra *Xanthomonas vesicatoria*.

Fiori-Tutida (2003) não observou indução de peroxidases em plantas de trigo tratadas com extratos brutos de *A. blazei* e *L. edodes* e inoculadas com *Bipolaris sorokiniana*, mesmo para os tratamentos onde houve redução na severidade da doença.

6.3.3.2 Atividade de polifenoloxidasas

Para a atividade de polifenoloxidasas (Figura 6.5 e 6.6) não foi observada diferença estatística para quaisquer tratamentos nos diferentes dias de amostragem, no entanto, a tendência observada foi de incremento na atividade logo após o tratamento

(primeiro dia após o tratamento) e após a inoculação (sexto dia após o tratamento), momento este, onde o incremento tornou-se mais evidente.

Observou-se incremento significativo na atividade de polifenoloxidasas no terceiro trifólio (tratado e inoculado) em relação ao quarto (apenas inoculado), sendo na média 41,7% superior (Figuras 6.5 e 6.6).

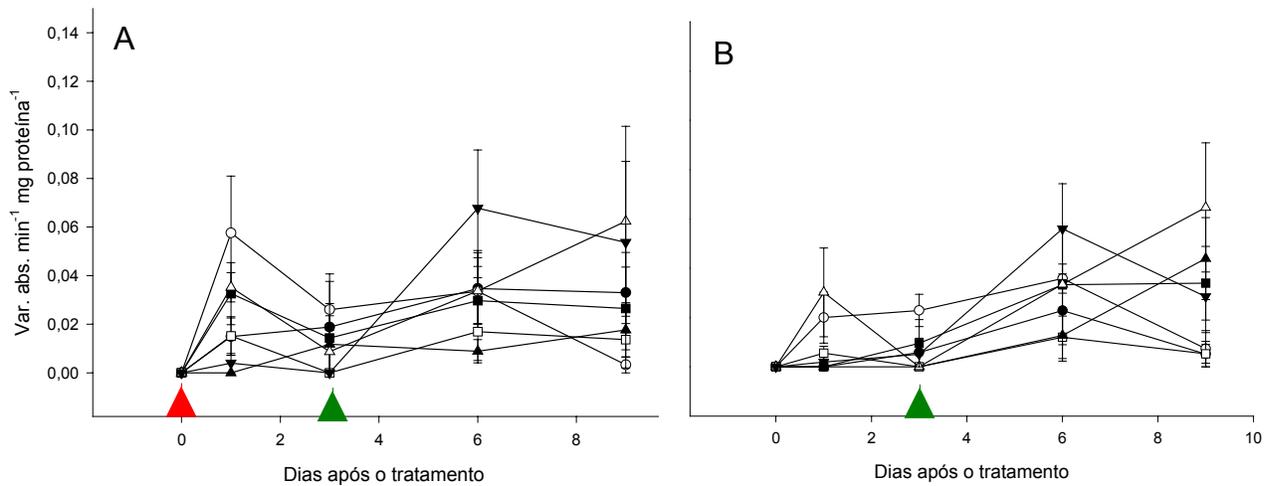


Figura 6.5. Atividade de polifenoloxidasas em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 1,09. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al (2008), os quais concluíram que polifenoloxidase não é um bom marcador de resistência para o patossistema berinjela-*Ralstonia solanacearum*, visto que tratamentos com diferentes isolados de *L. edodes* e *A. blazei* não mostraram diferenças significativas em relação ao tratamento água, exceto o tratamento Abl-11, que provocou elevação na atividade de polifenoloxidase no 7º dia após o tratamento. Silva et al. (2007) também não obteve correlação entre atividade de polifenoloxidasas e incidência de murcha bacteriana em

tomateiro, observando até mesmo uma diminuição da atividade nas plantas tratadas com os indutores e inoculadas com a bactéria *R. solanacearum*.

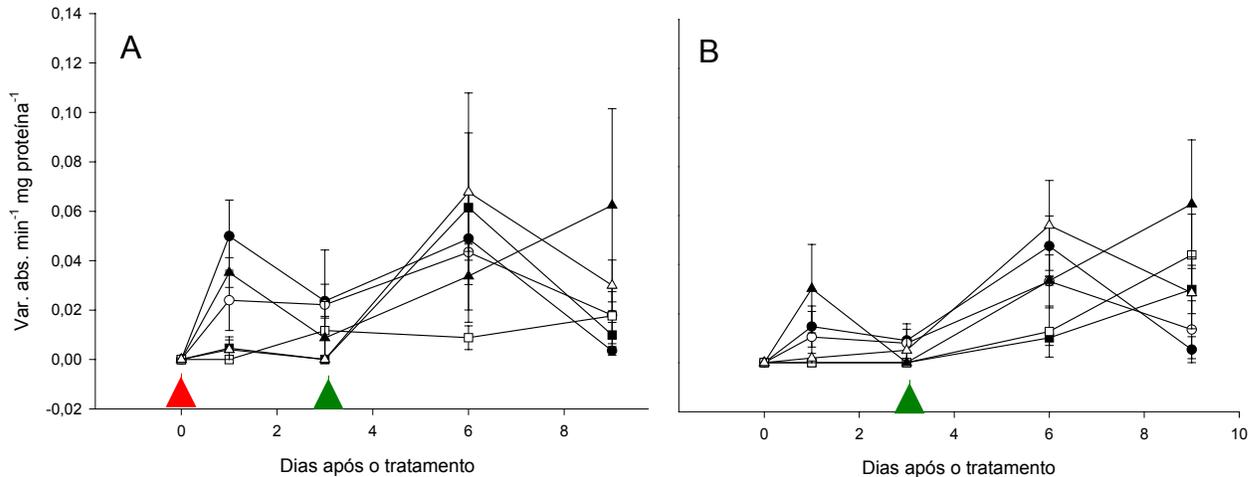


Figura 6.6. Atividade de polifenoloxidasas em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-△-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 1,09. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Baldo (2008), avaliando a atividade de polifenoloxidasas em plantas de feijão tratadas com extratos de *P. sanguineus* contra *C. lindemuthianum*, observou resultados semelhantes a este trabalho, não havendo incremento na atividade enzimática pela aplicação dos tratamentos, sendo observada inibição em alguns casos. Entretanto, Viecelli (2008) observou incrementos significativos na atividade de polifenoloxidasas em feijoeiro tratado com extratos de basidiocarpo (10 e 20%), micélio 10% e filtrado de cultura 10% de *P. sanguineus* e inoculado com *Pseudocercospora griseola*, demonstrando indução local e sistêmica.

6.3.3.3 Atividade de β -1,3 glucanases

A atividade de β -1,3 glucanases foi superior em geral para o terceiro trifólio (atividade local), sendo a maior indução observada três dias após os tratamentos.

Para o terceiro trifólio (Figura 6.7. A) houve diferença estatística para os tratamentos com fração glicídica e frações protéicas III (3,44 KDa) e V (1,82 KDa), os quais se mostraram superiores ao EB 20% no terceiro dia após o tratamento, nenhum deles, porém, diferindo das testemunhas. No sexto dia após o tratamento houve superioridade de Pico III em relação à testemunha água.

Para o quarto trifólio (Figura 6.7 B), observou-se diferença estatística para o tratamento EB 20%, o qual se mostrou superior a fração protéica III e a testemunha água já no primeiro dia após o tratamento.

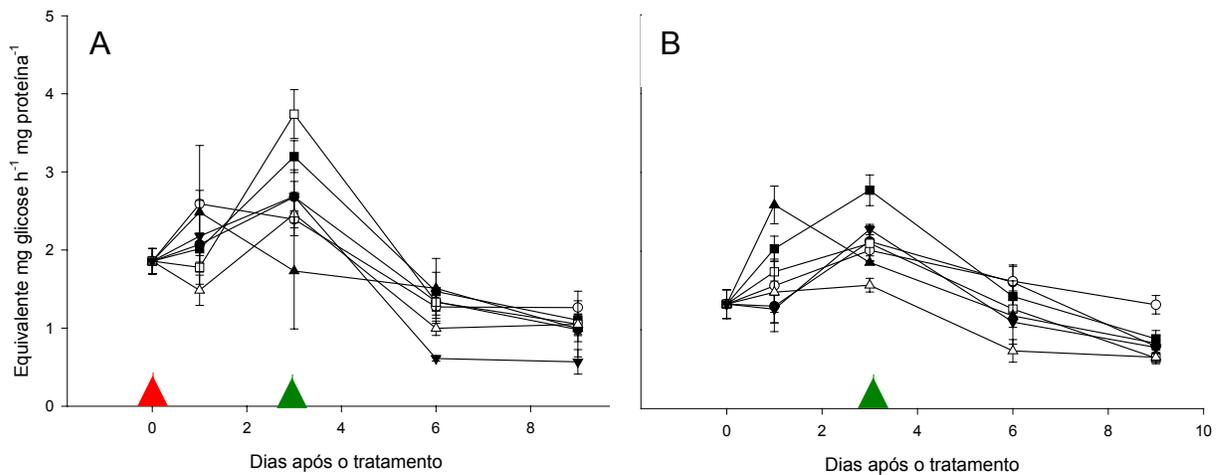


Figura 6.7. Atividade de β -1,3 glucanases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguines*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 29,17. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Quanto aos tratamentos obtidos por precipitação com SA, o Corte 40-60% foi superior ao EB 20% para o terceiro trifólio (Figura 6.8. A) no terceiro dia após o tratamento. No sexto dia após o tratamento houve superioridade de Corte 60-80% em relação às testemunhas água e Tebuconazole.

Para o quarto trifólio observa-se maior atividade do tratamento EB 20% em relação à testemunha água no primeiro dia após o tratamento (Figura 6.8. B).

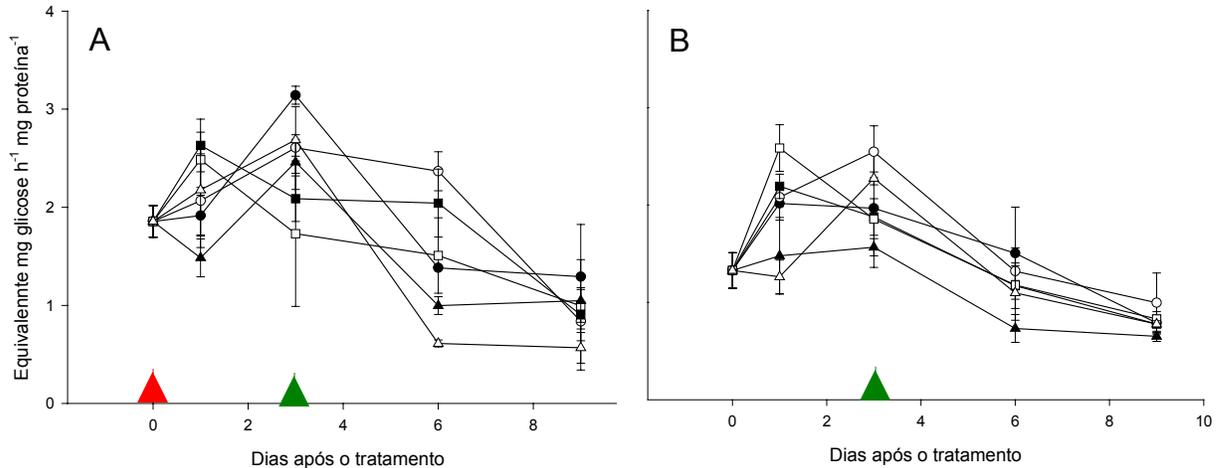


Figura 6.8. Atividade de β -1,3 glucanases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 29,17. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Viecelli (2008) observou variações na atividade de β -1,3 glucanases em plantas de feijão tratadas com extratos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* e inoculadas com *Pseudocercospora griseola*, entretanto apenas o tratamento micélio 10% estimulou a atividade enzimática aos três dias após a inoculação, os demais tratamentos apresentaram efeito negativo na atividade de β -1,3 glucanases.

Resultado diferente foi obtido por Di Piero (2003), o qual não observou acúmulo local ou sistêmico de gucanases pela aplicação de extrato aquoso de basidiocarpos de *L. edodes* em plantas de pepino. Entretanto, o mesmo autor, obteve indução de glucanases em plantas de tomate pelo tratamento com basidiocarpos de *A. blazei*, demonstrando haver relação entre a atividade de glucanases no decorrer do tempo e a proteção de plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria*.

6.3.3.4 Atividade de quitinases

Para quitinases, tanto para os tratamentos obtidos por CFG (Figura 6.9) ou precipitação com SA (Figura 6.10), observa-se aumento significativo na atividade três dias após o tratamento, sendo mais visível para o terceiro trifólio (tratado e inoculado) em relação ao quarto (não tratado e inoculado), além de maior atividade enzimática média para o terceiro trifólio em relação ao quarto. Entretanto, não houve diferença estatística entre quaisquer tratamentos durante o período de coleta.

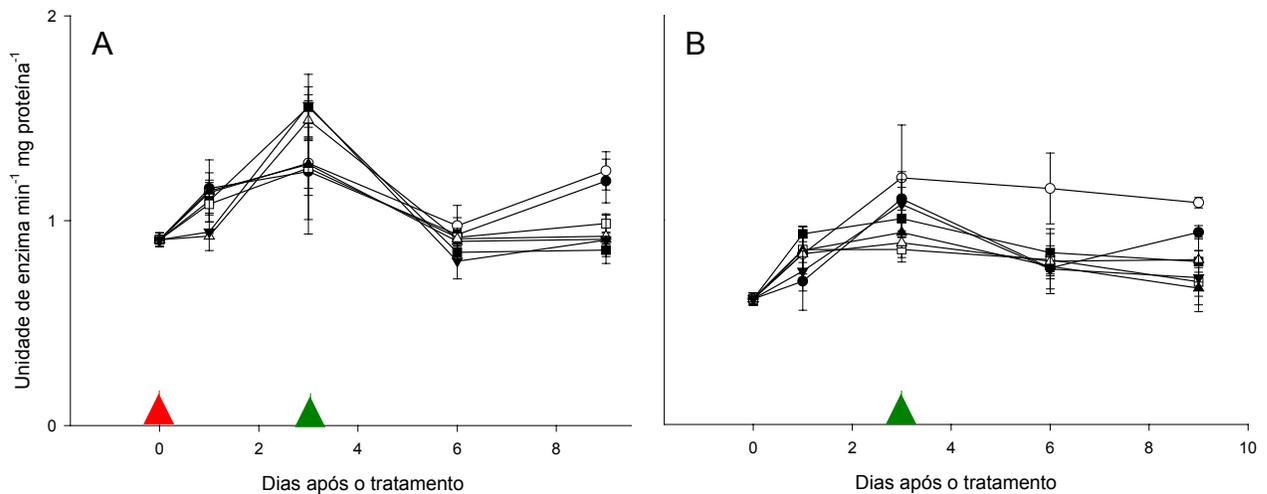


Figura 6.9. Atividade de quitinase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguines*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 19,73. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

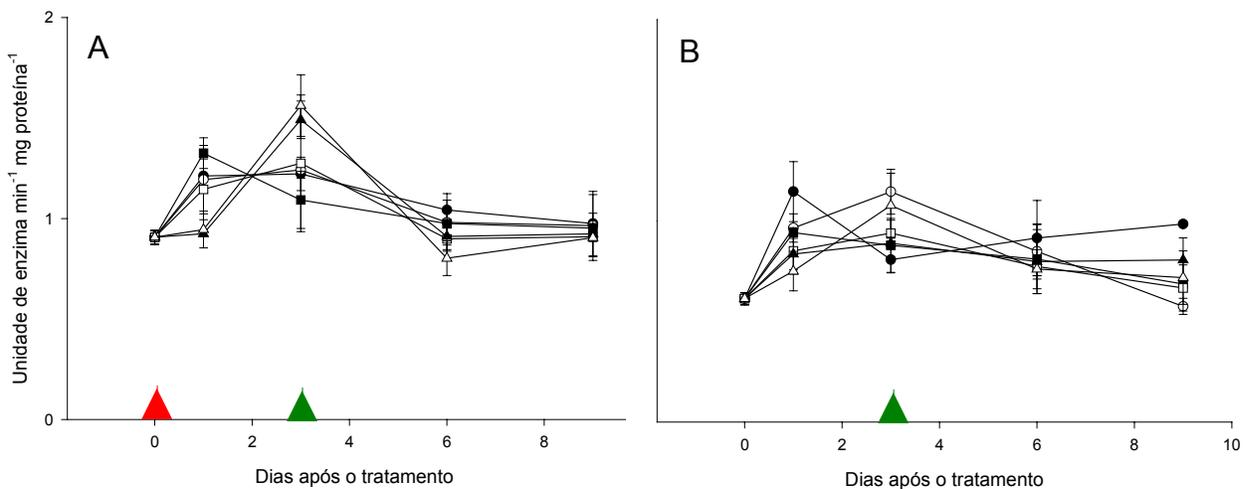


Figura 6.10. Atividade de quitinases em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-△-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 19,73. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2008), os quais não observaram incremento na atividade de quitinases em plantas de berinjela tratadas com extratos de basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei*, inoculadas ou não com *Ralstonia solanacearum*. Semelhantemente, Silva et al. (2007), observaram que em plantas de tomate tratadas com extratos de *L. edodes* e *A. blazei* e inoculadas com a bactéria *R. solanacearum* foi menor a atividade desta enzima em todas as avaliações em relação às plantas tratadas com água e inoculadas com a bactéria, exceto para o material amostrado no 3º dia após o tratamento com Le-96/17.

Di Piero (2003) observou acúmulo local e sistêmico de quitinases em plantas de pepino tratadas com extrato aquoso de shiitake e inoculadas com *C. lagenarium*, sendo que este maior acúmulo, significativamente superior à testemunha água, pode ter auxiliado na defesa da planta.

6.3.3.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase

Na Figura 6.11 observa-se a atividade de fenilalanina amônia-liase de plantas tratadas com frações parcialmente purificadas por CFG. No terceiro dia após o tratamento, a testemunha água apresentou maior atividade em relação aos demais para o terceiro trifólio (Figura 6.11. A). Já no sexto dia após o tratamento, o EB 20% mostrou-se superior, porém não diferindo estatisticamente das testemunhas água e Tebuconazole. No nono dia após o tratamento, Tebuconazole mostrou-se estatisticamente inferior aos tratamentos com as frações protéicas III (3,44 KDa), IV (2,79 KDa) e glúcida, todos para o terceiro trifólio.

Para o quarto trifólio (Figura 6.11. B) houve diferença estatística apenas no sexto dia após o tratamento, quando EB 20% mostrou-se superior aos demais, não diferindo apenas das testemunhas água e Tebuconazole.

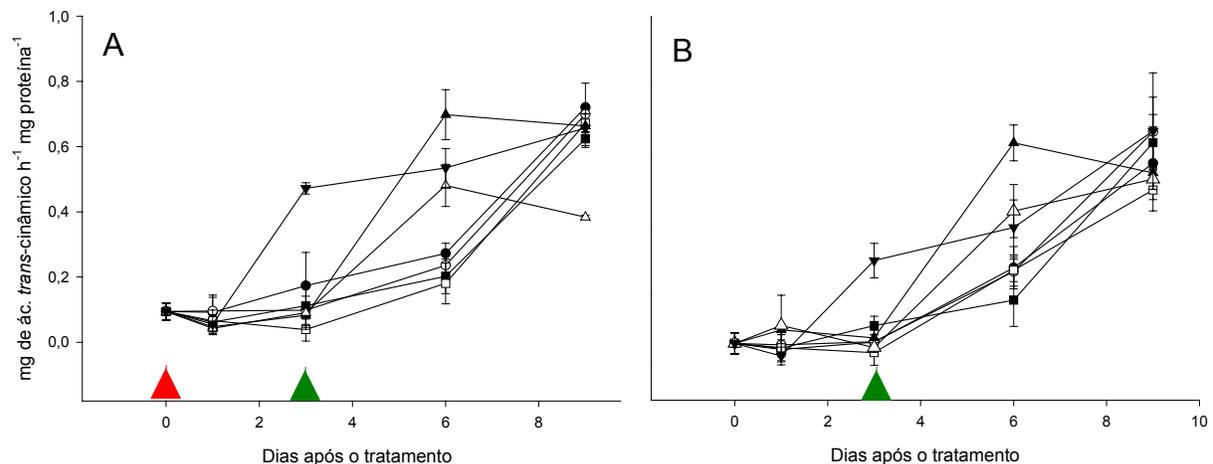


Figura 6.11. Atividade de fenilalanina amônia-liase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 37,29. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Na Figura 6.12 observa-se a atividade de fenilalanina amônia-liase de plantas tratadas com frações parcialmente purificadas por precipitação com SA. Para o terceiro trifólio (Figura 6.12. A), no terceiro dia após o tratamento, a testemunha água mostrou-se superior a todos os demais tratamentos. No sexto dia, os tratamentos Corte 80-100% e EB 20% mostraram-se estatisticamente superiores aos demais, porém não diferindo das testemunhas água e Tebuconazole. No nono dia de coleta, o tratamento Corte 80-100% apresentou-se estatisticamente superior ao Tebuconazole.

Para o quarto trifólio (Figura 6.12. B) observou-se diferença estatística apenas no sexto dia após o tratamento, quando EB 20% e Corte 80-100% mostraram-se superiores aos demais, não diferindo, porém, das testemunhas água e Tebuconazole e do tratamento Corte 60-80%.

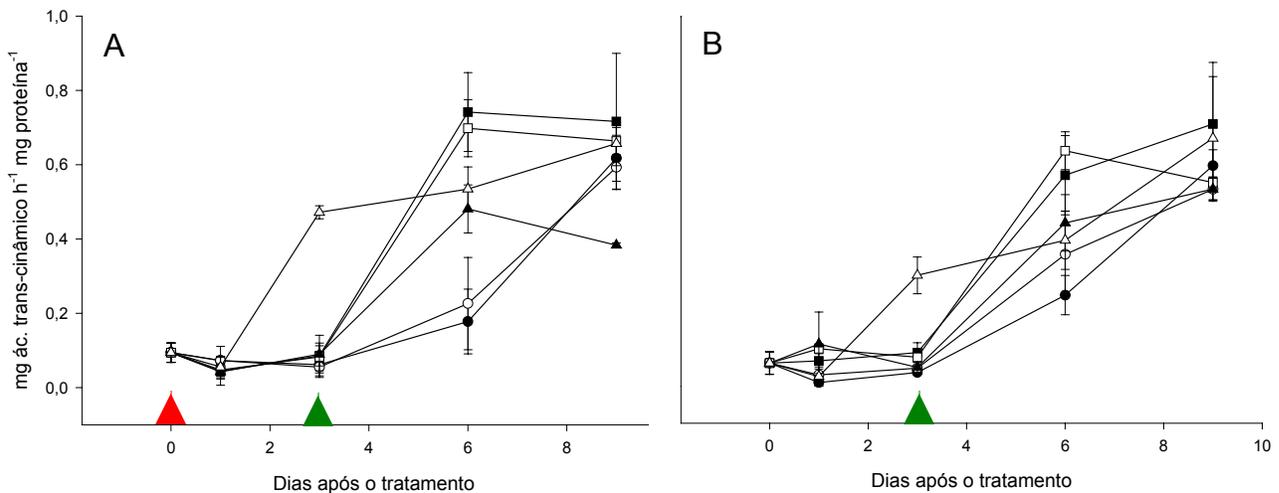


Figura 6.12. Atividade de fenilalanina amônia-liase em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-△-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 37,29. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Silva et al. (2008) observaram incremento na atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de berinjela tratadas com extratos dos isolados Abl-28 e Abl-11 de *A. blazei*. Porém, quando as plantas foram tratadas e posteriormente inoculadas com *R.*

solanacearum houveram diferenças significativas em relação aos tratamentos e a testemunha água. Silva et al. (2007) observou a mesma tendência quando plantas de tomate foram tratadas com extratos de *L. edodes* e *A. blazei* e inoculadas com *R. solanacearum*.

Baldo (2008) obteve indução de fenilalanina amônia-liase em feijoeiro tratado com extratos de *P. sanguineus* e inoculado com *C. lindemuthianum* em diferentes dias após o tratamento. De acordo com o autor o somatório da atividade específica na 1ª folha (tratada e inoculada), o extrato do filtrado de cultura 10% diferiu estatisticamente da testemunha água, induzindo a atividade da enzima em 42%. O extrato do micélio 10% diferiu estatisticamente da testemunha tanto para a 1ª quanto para a 2ª folha (apenas inoculada).

6.3.4 Alterações fisiológicas

6.3.4.1 Teor de clorofila *a*

Na Figura 6.13 são apresentados os dados referentes ao teor de clorofila *a* para plantas tratadas com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* por CFG. Para o terceiro trifólio (Figura 6.13. A), observa-se um maior teor de clorofila *a*, no primeiro dia após o tratamento, para a testemunha água, seguida do tratamento EB 20%, porém estatisticamente superiores apenas à fração protéica V (1,82 KDa). No terceiro dia, os tratamentos água, EB 20% e Tebuconazole apresentaram-se superiores, não diferindo, porém, à fração protéica III (3,44 KDa). Nos demais dias de coleta o teor de clorofila *a* mostrou-se semelhante para todos os tratamentos.

O teor de clorofila *a* no quarto trifólio (Figura 6.13. B) apresentou diferença estatística somente três dias após o tratamento, quando EB 20% foi superior aos demais, porém não diferindo das testemunhas.

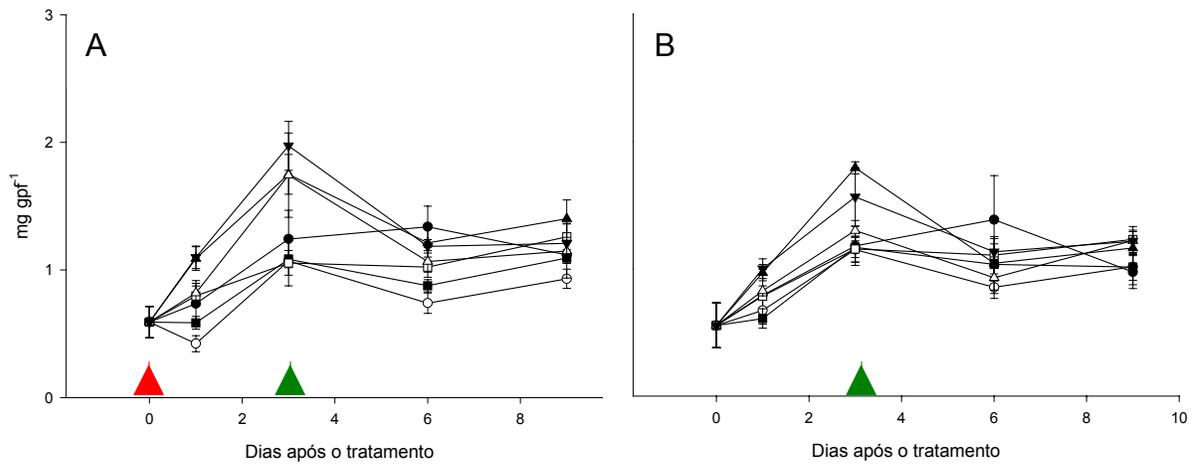


Figura 6.13. Teor de clorofila *a* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguines*); (-Δ-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 21,37. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

O teor de clorofila *a* para plantas tratadas com frações parcialmente purificadas por precipitação com SA (Figura 6.14) foi superior para os tratamentos água, EB 20% e Tebuconazole no terceiro dia após o tratamento no terceiro trifólio (Figura 6.14. A). No quarto trifólio (Figura 6.14. A) apenas o EB 20% mostrou-se superior a Corte 60-80%. Nos demais dias de coleta os tratamentos mostraram-se estatisticamente semelhantes.

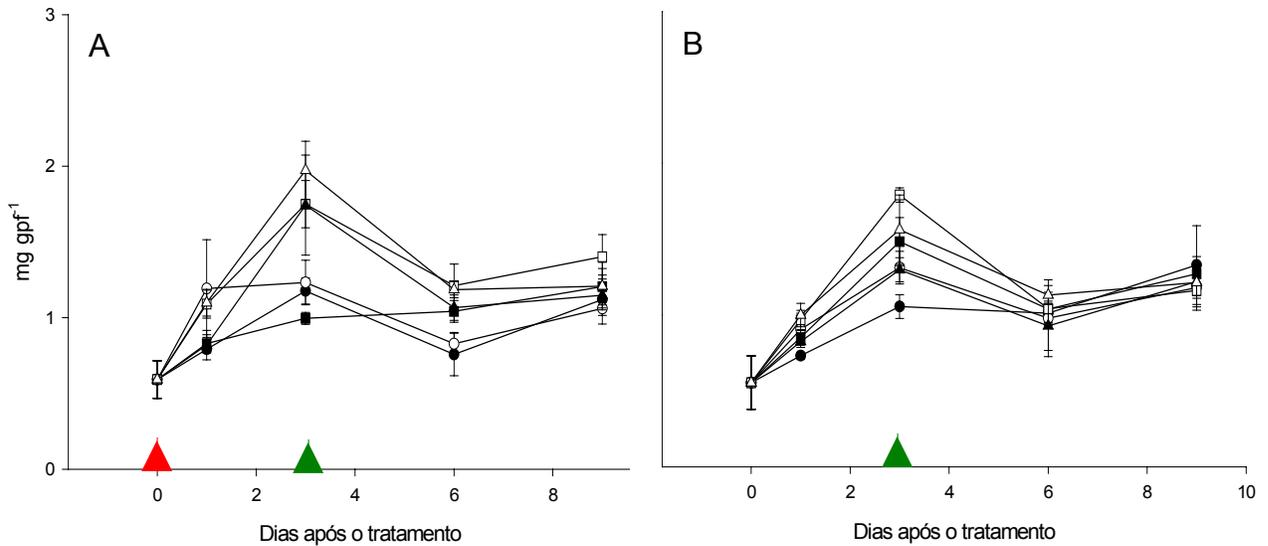


Figura 6.14. Teor de clorofila *a* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 21,37. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Os resultados obtidos indicam uma tendência a redução no teor de clorofila *a* pelos tratamentos obtidos pela purificação parcial do EB de *P. sanguineus*, enquanto EB 20% e as testemunhas apresentaram níveis superiores. Observa-se, porém, uma redução média no teor de clorofila *a* para todos os tratamentos após a inoculação com o patógeno *P. pachyrhizi*, diferentemente do observado por Livne (1964), onde para doenças causadas por patógenos biotróficos, mais precisamente do tipo ferrugem, em estágios iniciais da infecção, a fotossíntese permanece praticamente inalterada e mesmo um acréscimo no nível de clorofila pode ocorrer. Stangarlin & Pascholati (2000), estudando alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de feijão inoculadas com *Uromyces appendiculatus*, observaram incremento no conteúdo de clorofilas em plantas suscetíveis e resistentes logo após a inoculação.

Viecelli (2008), trabalhando com o patossistema feijoeiro-*Pseudocercospora griseola*, obteve resultados diferentes aos obtidos neste trabalho, verificando que o extrato de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 20% foi capaz de elevar os teores de clorofila *a*, sendo superiores aos das testemunhas água e fungicida (azoxystrobin 40 mg

i.a. L⁻¹). Extrato de micélio e filtrado de cultura também foram capazes de influenciar positiva e/ou negativamente nos teores de clorofila *a*.

Kuhn (2007), não observou alterações significativas na fotossíntese de plantas de feijão tratadas com *Bacillus cereus* e ASM, entretanto o indutor ASM apresentou tendência em reduzir a atividade fotossintética, apesar de não diferir estatisticamente dos demais tratamentos em nenhuma das épocas de coleta.

6.3.4.2 Teor de clorofila *b*

Na Figura 6.15 são apresentados os dados de teor de clorofila *b* em plantas tratadas com frações de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por CFG. No primeiro dia após o tratamento, para o terceiro trifólio (Figura 6.15 A), observou-se maior teor de clorofila *b* para a testemunha água, sendo estatisticamente superior à fração protéica IV (2,79 KDa). Já no terceiro dia após o tratamento, observa-se teores significativamente superiores para os tratamentos água, EB 20% e Tebuconazole, sendo que os últimos não diferiram dos tratamentos com as frações protéicas III (3,44 KDa) e IV. No quarto trifólio (Figura 6.15 B) não houve diferença estatística entre os tratamentos, apesar de um visível incremento no terceiro dia após o tratamento para o tratamento EB 20% e água.

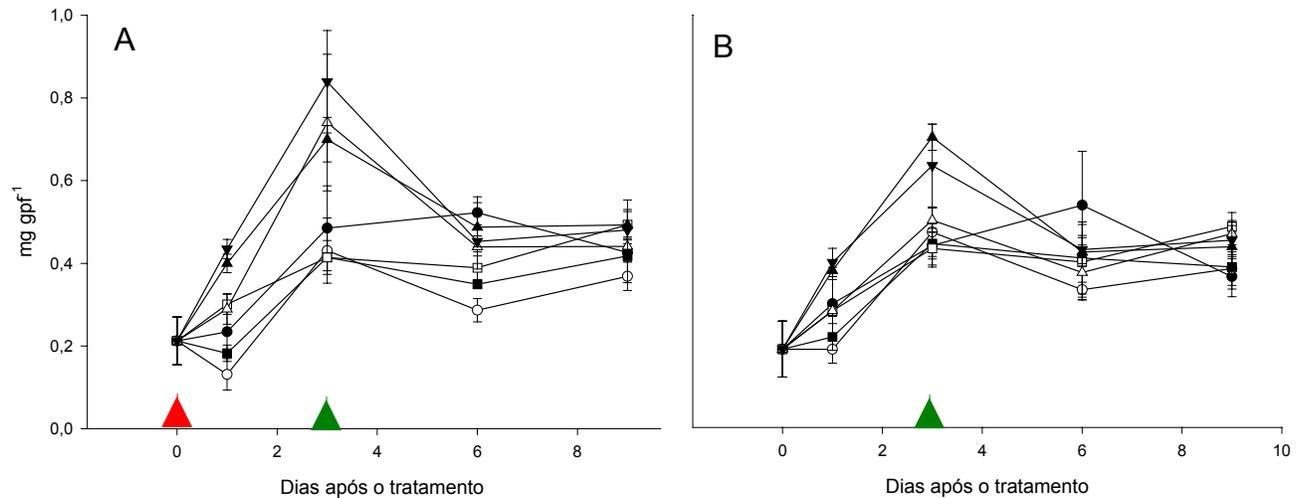


Figura 6.15. Teor de clorofila *b* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 24,75. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Na Figura 6.16 são apresentados os dados referentes ao teor de clorofila *b* para plantas tratadas com frações de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com SA. Para o terceiro trifólio (Figura 6.16. A), observa-se diferença significativa apenas para a testemunha água, no terceiro dia após o tratamento, a qual apresentou teor de clorofila *b* superior ao Corte 80-100%. No quarto trifólio (Figura 6.16. B) houve diferença estatística somente no terceiro dia de coleta, quando EB 20% apresentou-se superior a Corte 40-60%.

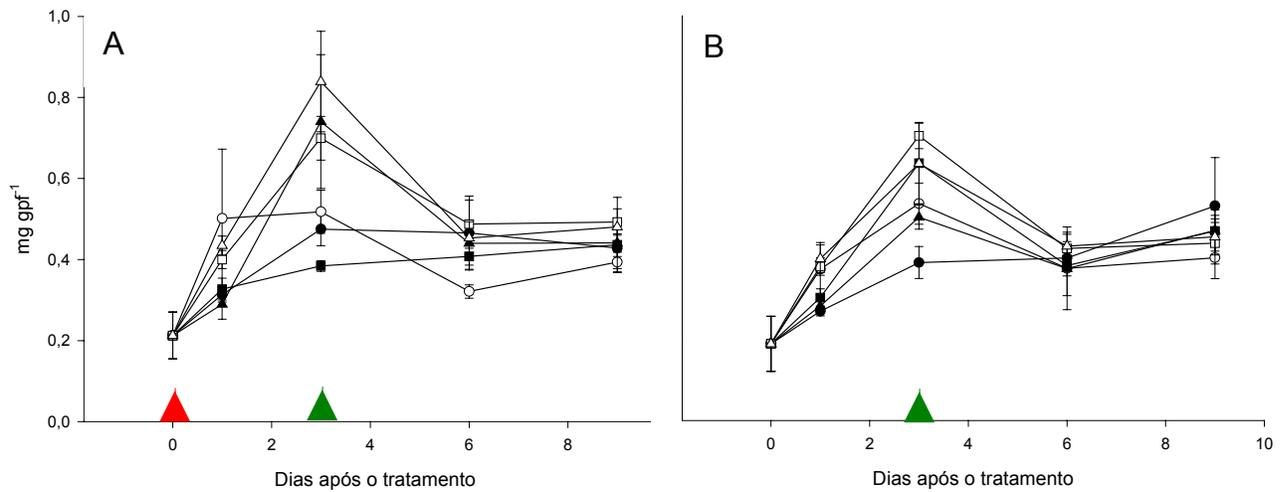


Figura 6.16. Teor de clorofila *b* em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3º trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3º e 4º trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 24,75. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Os resultados obtidos referentes ao teor de clorofila *b* são semelhantes aos obtidos para clorofila *a*, onde os tratamentos obtidos por purificação parcial, tanto por CFG como por precipitação com SA, apresentaram tendência em reduzir o teor de clorofilas em relação às testemunhas, apenas o EB 20% apresentou superioridade, sendo semelhante às testemunhas.

Da mesma forma que para clorofila *a*, houve redução nos teores de clorofila *b* após a inoculação das plantas com o patógeno *P. pachyrhizi*.

Semelhantemente ao que ocorreu com os teores de clorofila *a*, Viecelli (2008) observou incrementos significativos no conteúdo de clorofila *b* em plantas de feijão tratadas com extratos de *P. sanguineus* e inoculadas com *P. griseola*, o que não ocorreu para o presente trabalho, onde o conteúdo de clorofilas apresentou uma tendência de redução para os tratamentos com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus*.

6.3.4.3 Teor de carotenóides

Observa-se na Figura 6.17 os teores de carotenóides em plantas tratadas com frações parcialmente purificadas de *P. sanguineus* por CFG. Para o terceiro trifólio (Figura 6.17. A), no primeiro dia após o tratamento houve superioridade da testemunha água em relação ao tratamento com a fração protéica IV (2,79 KDa), porém, não diferindo dos demais. Já no terceiro dia após o tratamento, o teor de carotenóides foi superior para a testemunha água em relação aos tratamentos com as frações protéicas IV, V (1,82 KDa) e glúcida. Para o quarto trifólio (Figura 6.17. B) não houve diferença estatística.

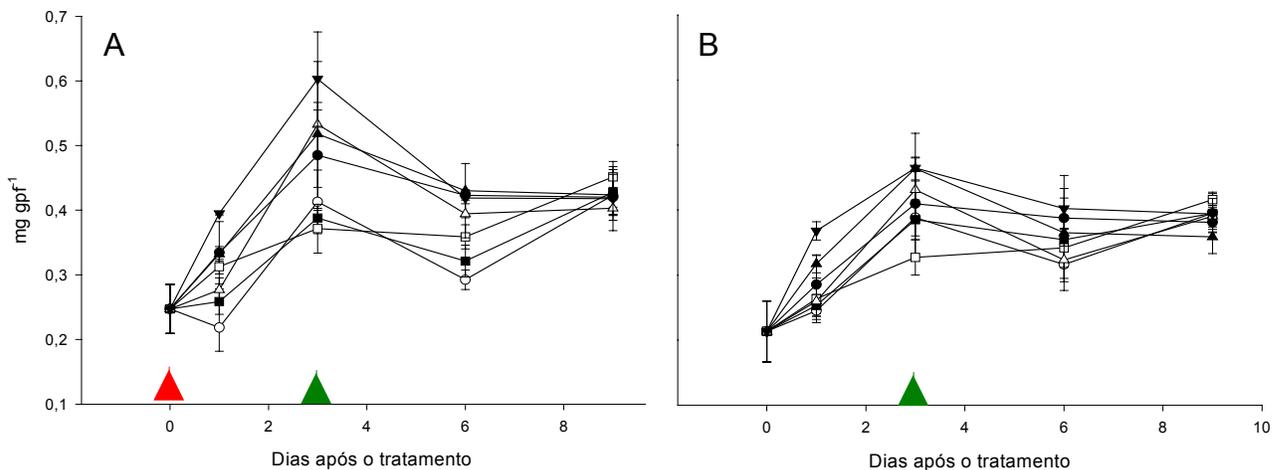


Figura 6.17. Teor de carotenóides em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel (CFG) e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Pico protéico III; (-○-): Pico protéico IV; (-■-): Pico protéico V; (-□-): Pico de carboidratos; (-▲-): EB 20% (extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-△-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); e (-▼-): água. Barras representam a média ± desvio padrão. CV% = 16,73. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

A Figura 6.18 apresenta os dados referentes aos teores de carotenóides em plantas tratadas com frações de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com SA. Para o terceiro trifólio (Figura 6.18. A) observa-se superioridade da testemunha água, não diferindo, porém, de EB 20% e Tebuconazole. Para o quarto

trifólio (Figura 6.18 B), no mesmo dia de coleta, houve superioridade da testemunha água e EB 20% em relação ao Corte 40-60%.

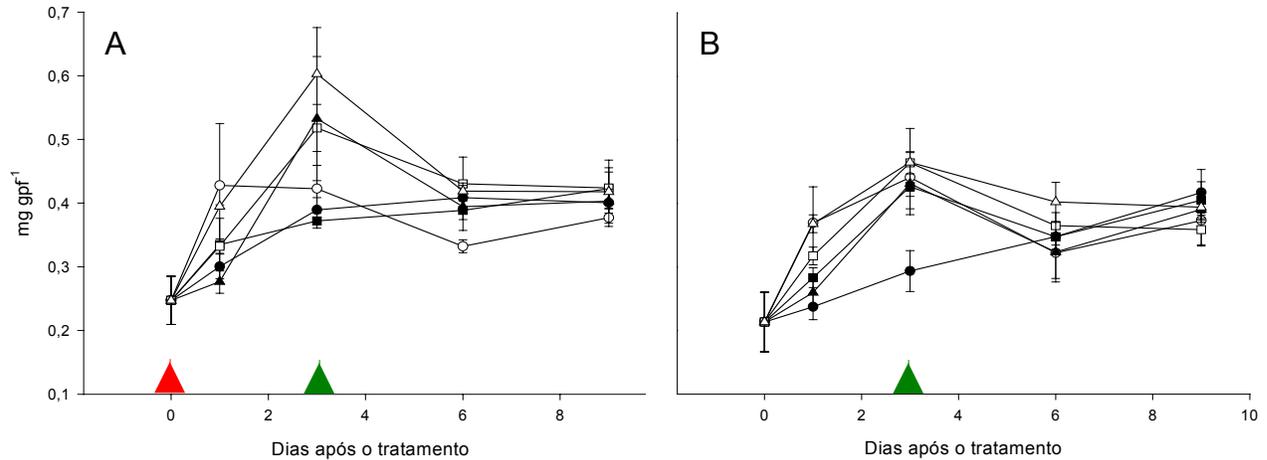


Figura 6.18. Teor de carotenóides em soja tratada com frações de basidiocarpos de *P. sanguineus* parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônia e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os tratamentos foram realizados no 3^o trifólio (A) três dias antes da inoculação que ocorreu no 3^o e 4^o trifólio (B). (-●-): Corte 40-60%; (-○-): Corte 60-80%; (-■-): Corte 80-100%; (-□-): EB 20% (extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus*); (-▲-): Tebuconazole (0,5 g i.a. L⁻¹); (-Δ-): água. Barras representam a média \pm desvio padrão. CV% = 16,73. Seta vermelha indica tratamento, seta verde indica inoculação.

Os dados referentes ao teor de carotenóides, semelhantemente ao que ocorreu com clorofilas *a* e *b*, indicam inibição por parte das frações parcialmente purificadas, além de uma redução nos teores após a inoculação com o patógeno. A capacidade de induzir mecanismos de defesa, por parte dos tratamentos em questão, pode reduzir o teor de pigmentos fotossintetizantes e conseqüentemente interferir negativamente na fotossíntese, sendo que isso pode significar menor incorporação de carbono e em conseqüência menor crescimento da planta e menor produtividade (KUHN, 2007).

6.4 CONCLUSÃO

As frações obtidas a partir do extrato bruto de *P. sanguineus*, assim como o EB 20%, não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação “*in vitro*” de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

A fração protéica III (3,44 kDa) obtida por CFG e o extrato bruto de *P. sanguineus* 20% foram os tratamentos mais eficientes no controle de ferrugem asiática em soja.

Houve indução de mecanismos de defesa local e sistemicamente, havendo principalmente indução da atividade de β -1,3 glucanases pelas frações glúcida e protéicas III e V (1,82 kDa), obtidas por CFG, e pelas frações 40-60% e 60-80%, obtidas por precipitação com SA, em relação ao EB 20%, sendo que o mesmo apresentou indução sistêmica para essa enzima.

Para peroxidases, o EB 20% apresentou tendência em reduzir a atividade enzimática.

Para fenilalanina amônia-liase as frações purificadas de *P. sanguineus* apresentaram tendência em reduzir a atividade enzimática, com exceção para EB 20% e corte com SA 80-100%.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, verificou-se que a inoculação do patógeno *P. pachyrhizi*, resultou de uma maneira geral em redução do teor de clorofila *a* e *b* e carotenóides, principalmente no terceiro trifólio, onde foi realizada a inoculação.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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*. **Summa Phytopathologica**, v.34 (suplemento), p.S64, 2008.

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*.** Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

BONALDO, S.M; PASCHOLATI, S.F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, 2007.

COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL 1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.273-282, 2002.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.85, p.1219-1224, 1995.

DI PIERO, R.M.; WULFF N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 175-180, 2006.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n.1, 2004.

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

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Paraná – 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 217p.

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* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.287-289, 2007.

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 à *Bipolaris sorokiniana***. Maringá, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM – Universidade Estadual de Maringá.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GODOY, C.V. & FLAUSINO, A.M. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja em Londrina e Tamarana, PR, na safra 2007/08**. Londrina: Embrapa Soja, 2008.

GODOY, C.V. & CANTERI, M.G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.1, p.97-101, 2004.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 21 de nov. de 2008.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (Eds.), **Methods in enzymology**. San Diego, GA: Academic Press, 1987. v.48, p.350–382.

LIVNE, A. Photosynthesis in healthy and rust affected plants. **Plant Physiology**, v.39, p.614-621, 1964.

PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI? In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.115-116, 2003.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v.13, p. 411-431.

SANTOS, J.A.; JULIATTI, F.C.; SANTOS, V.A.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C.; HAMAWAKI, O.T. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.3. p.443-447, 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.137-144, 2008.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.3, p.189-196, 2007.

SIMS, D.A.; GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v.81, p. 337–354, 2002.

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

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

TOILLIER, S.L. **Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus***. Marechal Cândido Rondon, 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

TOILLIER, S.L.; BALDO, M.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O.J.; PEITER-BENINCA, C.; STANGARLIN, J.R. Efeito in vitro de extratos de *Pycnopus sanguineus* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), 2007.

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

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

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios I e II, pode-se concluir que houve maior atividade enzimática para os tratamentos obtidos por CFG em relação aos obtidos por precipitação com SA, em cotilédones de soja da cultivar CD 215. Esse resultado pode estar relacionado a diálise efetuada após a precipitação com SA, a qual foi realizada em membrana com limite de exclusão de 20000 Da, isso indica a provável perda das moléculas elicitoras de baixa massa molecular. Já na CFG verificou-se a presença de moléculas entre 1,82 e 5,18 kDa.

Em relação à síntese de gliceolinas, a indução por parte do extrato bruto 20% de *P. sanguineus* e a ausência de indução pelas frações parcialmente purificadas a partir do mesmo extrato, apontam para uma perda de atividade elicitora em função do fracionamento.

A fração protéica III (3,44 kDa) obtida por CFG e o extrato bruto de *P. sanguineus* 20% foram os tratamentos mais eficientes no controle de ferrugem asiática em soja, CD 215.

As frações obtidas a partir do extrato bruto de *P. sanguineus*, assim como o EB 20%, não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação “*in vitro*” de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, isso indica o alto potencial indutor de resistência principalmente da fração protéica III (3,44 kDa) obtida por CFG e o extrato bruto 20% de *P. sanguineus*, visto que foram capazes de controlar ferrugem asiática e induzir mecanismos de defesa, principalmente β -1,3 glucanases (fração protéica III) e gliceolinas (EB 20%).

Os mecanismos de defesa induzidos pelas frações protéica III e EB 20%, obtidas de *P. sanguineus* exercem ação direta sobre o patógeno visto que as gliceolinas são compostos biocidas e as β -1,3 glucanases hidrolizam um dos principais componentes da parede celular fúngica, a β -1,3 glucana, sendo eficiente no controle do fungo *P. pachyrhizi*.

A redução nos teores de pigmentos fotossintéticos que ocorreu para todos os tratamentos obtidos a partir de *P. sanguineus*, indica um alto requerimento energético pela planta tratada, o que pode interferir na produção.

APÊNDICE

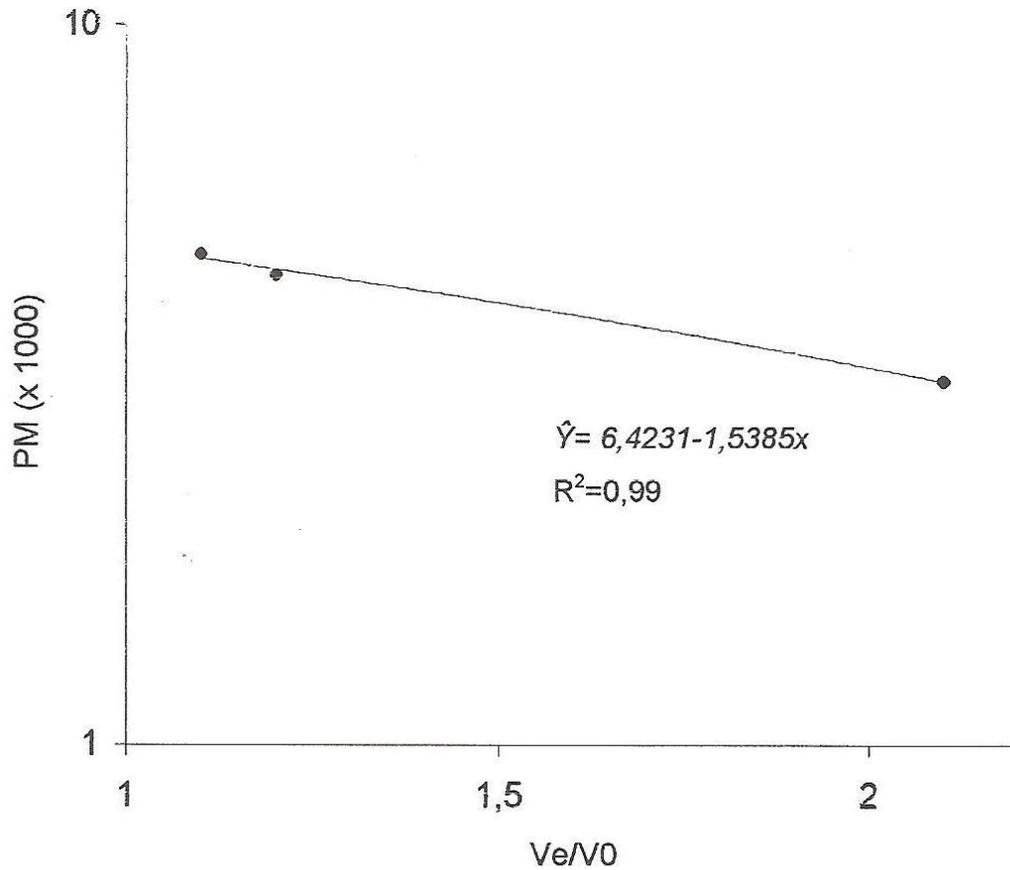


Figura 1. Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,0 cm x 58,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: albumina de soro bovino (66 KDa); anidrase carbônica (29 KDa) e bacitracina (1,45 KDa). O volume vazio da coluna (V_0) foi determinado com azul de dextrana, na concentração de 2 mg mL^{-1} . Amostras de 1 mL eluídas em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Frações coletadas de 2 mL, a fluxo de 1 mL min^{-1} .