

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

MAURICELE BALDO

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA INDUÇÃO DE  
RESISTÊNCIA EM FEIJOEIRO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR  
DERIVADOS DE *Pycnoporus sanguineus***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
MARÇO/2008

MAURICELE BALDO

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA INDUÇÃO DE  
RESISTÊNCIA EM FEIJOEIRO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR  
DERIVADOS DE *Pycnoporus sanguineus***

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

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RENATO STANGARLIN

MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
MARÇO/2008

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

B178a	Baldo, Mauricele Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> / Mauricele Baldo. - Marechal Cândido Rondon, 2008. vi, 72p.  Orientador : Prof. Dr. José Renato Stangarlin Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2008.  1. <i>Pycnoporus sanguineus</i> . 2. Controle alternativo. 3. Indução de resistência. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.  CDD 21.ed.635.652 632.9 CIP-NBR 12899
-------	--

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9/965

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Lesões causadas por antracnose em folha (A), haste (B) e vagem (C). Foto: Marcio Paulo Czepak.....16
- FIGURA 2. Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Foto: Mauricele Baldo.....35
- FIGURA 3. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria et al. (1999).....40
- FIGURA 4. Inibição da germinação de esporos de *C. lindemuthianum* na presença de extratos de basidiocarpos (A), micélio (B), filtrado (C) de *P. sanguineus* e meio batata-dextrose (D). Controles: acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e azoxystrobin (4 g i.a. L<sup>-1</sup>).....47
- FIGURA 5. Crescimento micelial de *C. lindemuthianum* na presença de extratos de micélio (A), filtrado (B) e basidiocarpo (C) de *P. sanguineus*. Controles: acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e azoxystrobin (4 g i.a. L<sup>-1</sup>). Colunas com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.....49
- FIGURA 6. Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (●), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento .....56
- FIGURA 7. Somatório da atividade de fenilalanina amônia-liase nas 1ª (■) e 2ª (■) folhas em função do tratamento com: água; fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.....57

FIGURA 8. Atividade específica de  $\beta$ -1,3 glucanase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (•), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 150 mg L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.....58

FIGURA 9. Somatório da atividade específica de  $\beta$ -1,3 glucanase nas 1ª (■) e 2ª (■) folhas em função do tratamento com: água; fungicida (azoxystrobin 4 g i.a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.....61

FIGURA 10. Atividade específica de peroxidase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (•), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 150 mg L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.....62

FIGURA 11. Somatório da atividade de peroxidase nas 1ª (■) e 2ª (■) folhas em função do tratamento com água; fungicida (azoxystrobin 4 g i.a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.....64

FIGURA 12. Atividade específica de polifenoloxidase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (•), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 150 mg L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.....65

FIGURA 13. Somatório da atividade de polifenoloxidase nas 1<sup>as</sup> (■) e 2<sup>as</sup> (▣) folhas em função do tratamento com água; fungicida (azoxystrobin 4 g i.a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.....67

FIGURA 14. Formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em feijoeiro tratado com extratos aquosos de micélio e de basidiocarpo de *P. sanguineus* e inoculados com *C. lindemuthianum*. A: água 46 h. a. i.; B: basidiocarpos 5% 48 h. a. i.; C: água 96 h. a. i.; D: água 192 h. a. i.; E: água 192 h. a. i.; F: micélio 5% 192 h. a. i.....68

FIGURA 15. Formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> em feijoeiro tratado com extratos aquosos de micélio e de basidiocarpo de *P. sanguineus* e inoculados com *C. lindemuthianum*. A: micélio 5% 42 h. a. i.; B: ASM 48 h. a. i.; C: basidiocarpo 5% 48 h. a. i.; D: ASM 96 h. a. i.; E: basidiocarpo 5% 96 h. a. i.; F: água 192 h. a. i.; G: fungicida 192 h. a. i.; H: basidiocarpo 5% 192 h. a. i.....70

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro tratado com extrato aquoso de micélio, filtrado e basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus*.....52
- TABELA 2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose causada por *C. lindemuthianum* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos (EA) de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*.....54

## RESUMO

### Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência. Extratos de basidiocarpos têm sido estudados no controle de doenças. Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito fungitóxico dos extratos aquosos de micélio (EAM), basidiocarpo (EAB) e filtrado de cultura (EAF) de *Pycnoporus sanguineus*, sobre *Colletotrichum lindemuthianum*; e avaliar o controle da antracnose em feijoeiro por estes extratos, bem como a indução de resistência pela determinação da atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), fenilalanina amônia-liase (FAL) e  $\beta$ -1,3 glucanase; além de detecção *in situ* das espécies reativas de oxigênio (ERO's)  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ . Para os ensaios *in vitro* foram utilizados os extratos nas concentrações 1, 5, 10, 15 e 20%, avaliando-se o crescimento micelial e germinação de esporos de *C. lindemuthianum*. Para os ensaios de severidade e determinação das enzimas, extratos nas concentrações 5 e 10% foram aplicados nas 1<sup>as</sup> folhas trifoliadas de feijoeiro, três dias antes da inoculação do patógeno ( $1 \times 10^4$  conídios  $mL^{-1}$ ) realizada nas 1<sup>as</sup> e 2<sup>as</sup> folhas. O mesmo procedimento foi adotado para detecção das ERO's, porém utilizados apenas EAM e EAB 5%. Água, acibenzolar-S-metil (75 mg i. a.  $L^{-1}$ ) e fungicida azoxystrobin (4 g i. a.  $L^{-1}$ ) foram utilizados como tratamentos controle para todos os ensaios. Para a dosagem das enzimas foram amostradas as 1<sup>as</sup> e 2<sup>as</sup> folhas no momento dos tratamentos e após 3, 6, 9, 12 e 27 dias. Para ERO's foram feitas avaliações às 48, 96 e 192 h após inoculação. Os resultados indicaram atividade antimicrobiana direta dos extratos, tendo estes inibido a germinação, porém não apresentaram efeito inibitório do crescimento micelial. Nas plantas, os EAF 5 e 10%, reduziram 69 e 67%, respectivamente, a severidade nas 1<sup>as</sup> folhas, enquanto o fungicida e ASM reduziram 87 e 76%, respectivamente. Nas 2<sup>as</sup> folhas as maiores reduções foram observadas para EAB 10% e EAF 5 e 10%, com redução média da severidade de 63%. Esta redução na severidade pode estar associada com POX, FAL e  $\beta$ -1,3 glucanase que apresentaram alterações na atividade específica, o que não foi observado para PFO. Não foi detectada formação de  $H_2O_2$  nas 48 e 96 h. Em 192 h os tratamentos EAB e EAM apresentaram desorganização citoplasmática e colapso das células epidérmicas semelhantes ao controle água. Nos tempos 48 e 96 h houve formação de  $O_2^-$  nos tratamentos EAM, EAB e ASM. Em 192 h todos os tratamentos apresentaram reação para  $O_2^-$  nas células epidérmicas e do mesófilo. Estes resultados indicam o potencial dos extratos de *P. sanguineus* no controle da antracnose do feijoeiro, que pode ocorrer tanto por indução de resistência local e sistêmica e/ou atividade antimicrobiana direta.

**Palavras-chave:** extratos de *Pycnoporus sanguineus*, controle alternativo, indução de resistência.

## ABSTRACT

### **Hystological and biochemical aspects of the resistance induction in bean plants and antifungal activity by *Pycnoporus sanguineus* extracts.**

One of the focus of the alternative agriculture is the disease control, wich include biological control, the induction of resistance in plants and the use of the natural products with antimicrobial activity and /or resistance induction. Basidiocarps extracts have been studied for disease control. This research focused the avaliation of the fungitoxic effect in the aqueous extracts of the mycelium (EAM), basidiocarps (EAB) and filtrate of culture (EAF) of *Pycnoporus sanguineus*, in the *Colletotrichum lindemuthianum*, and avaliate the control of anthracnose in the bean plant by theses extracts and the resistance induction through determination of activity of the enzyme peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PFO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and  $\beta$ -1,3 glucanase, besides detection *in situ* of the reatives oxygen species (ROS)  $H_2O_2$  and  $O_2^-$ . For the tests *in vitro* were utilized the extracts on concentration 1, 5, 10, 15 and 20%, avaliating the micelial growth and the germination of the *C. lindemuthianum* spores. In order to severity tests and determination of enzyme, extracts on concentrations 5 and 10% were applied on the 1<sup>st</sup> trifoliolate leaves of bean plant, three days before of the inoculation of the pathogen ( $1 \times 10^4$  conidia  $mL^{-1}$ ) on 1<sup>st</sup>s and 2<sup>nd</sup>s leaves. The same procediment was adopt for detection of ROS, instead utilized just EAM 5%, water, acibenzolar-S-methyl ( $150 \text{ mg i.a.L}^{-1}$ ) and azoxystrobin fungicide ( $4 \text{ g. i. a. L}^{-1}$ ). For the enzyme determination was amostrated the 1<sup>st</sup>s and 2<sup>nd</sup>s leaves at the moment of treatment and after 3, 6, 9, 12, 27 days. For ROS was made avaliations to 48, 96 and 192 hours after the inoculation. The results indicated direct antimicrobial activity of the extracts, having these extracts inhibited the germination, but they didn't inhibited the micelial growing. On plants, the EAF 5 e 10%, reduced 69 and 67% respectively, the severity on the 1<sup>st</sup>s leaves, while the fungicide and ASM reduced 87 and 76% respectively. On 2<sup>nd</sup>s leaves the more significative reductions were observed to EAB 10% and EAF 5 and 10%, with reduction of the severity of 63%. This reduction on severity can be associated with POX, PAL and  $\beta$ -1,3 glucanase what apresented alterations on the especific activity, what wasn't observed to PFO. The formation of  $H_2O_2$  wasn't detected, on 48 and 96 hours. In 192 hours the EAB treatment apresented citoplasmatic desorganization and collapse of epidermic cell similar to the water control. In times 48 and 96 hours there was of the  $O_2^-$  in the EAM, EAB and ASM treatment. In 192 all of the treatments apresented reaction to  $O_2^-$  in epidermic cells and the mesophyll. This results apoint the potencial of *P. sanguineus* extracts for the control of in the anthracnose in bean plants, that can occur by induction of the local and systemic resistance an/or antimicrobial direct activity.

**Key-words:** *Pycnoporus sanguineus* extracts, alternative control, resistance induction.

À Deus, e  
Aos meus amados pais, os maiores incentivadores desta jornada,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Criador e mantenedor da vida.

Ao Senhor Jesus pelas bênçãos recebidas.

Aos meus amados pais Marcelino e Odete Gallo Baldo, pelo amor incondicional proporcionado durante toda minha existência, pela busca incessante por basidiocarpos de *P. sanguineus* e inóculo de *Uromyces appendiculatus*, pelas sábias palavras de conforto em cada ensaio fracassado, pela compreensão e por todos os esforços não medidos para que eu pudesse chegar ao final desta jornada.

Às minhas irmãs Fabianne e Janarice Baldo, pela compreensão.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, pela oportunidade, orientação, atenção, paciência, compreensão, ensinamentos e pelas sábias palavras em todos os momentos.

Às minhas grandes amigas Luciana Iurkiv e Cristiane Cláudia Meinerez, que sempre estiveram à disposição para auxiliar na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia Ms. Gilmar Franzener (“My Friend”) e Prof. Dr. Odair José Khun pela paciência, pelos ensinamentos, auxílio e pelas palavras consoladoras.

À Sandra L. Toillier pelos trabalhos realizados em conjunto e compartilhamento das perdas.

À Heloisa M. Formentini, Simone Grisa, Márcia V. Toledo, Luciana Oliveira, pela amizade, compreensão e pelos bons momentos compartilhados.

Ao professor Dr. Cleber Furlanetto, por permitir a condução de parte deste trabalho no laboratório de Nematologia.

Aos vigias Antônio, Amaro, Geraldo, Olivo, José e Ló, por estarem sempre à disposição, inclusive nos momentos de risco.

Aos funcionários da Unioeste, Flávio, Emerson e Marcelo que auxiliaram na condução dos ensaios *in vivo*.

Aos meus amigos Jardel L. Gheller, Elio Wagatsuma e Marcelo B. Uliana pela disponibilidade em auxiliar na realização deste trabalho.

Ao amigo Lucas Primo pelos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.

Ao Dr. Robson M. Di Piero pelo auxílio na obtenção de inóculo.

À Dr<sup>a</sup> Kátia F. R. Schwan-Estrada pelo empréstimo de reagente para a condução das análises bioquímicas.

À Jucenei e ao amigo Ricardo R. Trautmann pelo auxílio no preparo de reagentes.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos (as) e à todos que contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO .....	14
2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO .....	15
2.2.1 Antracnose – <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Lams-Scrib .....	15
2.2.1.1 Sintomatologia .....	16
2.2.1.2 Etiologia .....	17
2.2.1.3 Epidemiologia .....	17
2.2.1.4 Controle .....	18
2.3 CONTROLE DE DOENÇAS .....	19
2.3.1 Controle alternativo de doenças .....	20
2.3.1.1 Indução de resistência .....	21
2.3.1.2 Indutores de resistência .....	21
2.3.1.2.1 Peroxidase .....	23
2.3.1.2.2 Polifenoloxidase .....	25
2.3.1.2.3 Fenilalanina amônia-liase (FAL) .....	27
2.3.1.2.4 $\beta$ -1,3-glucanase .....	28
2.3.1.2.5 Espécies reativas de oxigênio (EAO's) .....	29
2.3.2 Potencial de extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas .....	33
2.3.2.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L. ex Fr.) Murr .....	34
2.3.2.2. Potencial de <i>P. sanguineus</i> no controle de doenças de plantas .....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE <i>C. lindemuthianum</i> .....	36
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>P. sanguineus</i> .....	36
3.2.1 Extrato bruto de basidiocarpos de <i>P. sanguineus</i> .....	36
3.2.2 Micélio de <i>P. sanguineus</i> obtido do cultivo em meio líquido .....	37
3.2.3 Extrato do filtrado da cultura de <i>P. sanguineus</i> .....	37

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
3.3.1 Inibição de germinação de esporos.....	38
3.3.2 Inibição do crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> .....	38
3.4 ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	39
3.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	39
3.5.1 Coleta de amostras para análise bioquímica.....	41
3.5.2 Análises bioquímicas da resistência .....	41
3.5.2.1 Obtenção do extrato protéico.....	41
3.5.2.2 Determinação da atividade de peroxidases.....	41
3.5.2.3 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL).....	42
3.5.2.4 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3 glucanases.....	43
3.5.2.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase.....	43
3.5.3 Localização <i>in situ</i> de espécies ativas de oxigênio.....	44
3.5.3.1 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).....	44
3.5.3.2 Superóxido ( $O_2^-$ ).....	45
3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1 ENSAIO <i>IN VITRO</i> .....	46
4.1.1 Inibição da germinação de esporos.....	46
4.1.2 Inibição do crescimento micelial.....	48
4.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> .....	50
4.2.1 Severidade .....	50
4.3 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA .....	54
4.3.1 Dosagem de fenilalanina amônia-liase (FAL).....	54
4.3.2 Dosagem de $\beta$ -1,3-glucanases .....	58
4.3.3 Dosagem de Peroxidases .....	61
4.3.4 Dosagem de polifenoloxidase.....	64
4.4 LOCALIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	67
4.4.1 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) .....	67
5.3.2 Superóxido ( $O_2^-$ ).....	69
5 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

“...Há ainda pequena proporção de fitopatologistas dedicados ao controle alternativo no Brasil. É preciso aumentar esse contingente, para que a fitopatologia possa dar maior contribuição à sustentabilidade ambiental e social da agricultura brasileira.”  
Wagner Bettiol, 2004

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura amplamente difundida no Brasil, que é o maior produtor e consumidor mundial. Apesar disso, a produtividade média das lavouras brasileiras não chega aos 900 kg por hectare, média muito inferior a obtida nos países desenvolvidos. Atribui-se a baixa produtividade a utilização de sementes de baixa qualidade, e principalmente a problemas fitossanitários. A cultura é acometida por várias doenças fúngicas que podem ocasionar redução da produtividade, como a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* Lams-Scrib.

Como não há variedades resistentes a todas as doenças e que sejam adaptadas às diferentes regiões de cultivo, o controle das doenças do feijoeiro tem sido feito tradicionalmente com o uso de fungicidas químicos, pois estes em curto prazo mostram-se benéficos, mas em longo prazo tornam-se prejudiciais uma vez que deixam resíduos no ambiente e nos produtos vegetais. Em função disso, há a necessidade de métodos alternativos de controle, como a exploração de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência.

O controle alternativo envolve o controle biológico, onde se têm o controle de um microrganismo através da ação direta de outro microrganismo, e também a indução de resistência, onde a planta tem seus mecanismos de defesa a fitopatógenos ativados pelo tratamento com agentes de origem biótica ou abiótica, os chamados elicitores.

Vários compostos de basidiocarpos já se mostraram eficientes no controle de doenças. Estudos com extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* revelaram estes como potenciais indutores de resistência em pepino no controle de *Colletotrichum*

*lagenarium*, e em trigo à *Bipolaris sorokiniana*, entre outras, além do potencial antimicrobiano direto de tais extratos.

Além desses dois basiomicetos citados, há também relatos do uso de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de fitomoléstias, como no caso da antracnose em feijoeiro. *P. sanguineus* é um fungo saprófita, da divisão *Basidiomycota*, com basidiocarpos de coloração vermelho-alaranjada, que atua na decomposição de determinados tipos de madeira, e que há muito tempo é utilizado em alguns países em função de suas propriedades medicinais e também pelo seu potencial antimicrobiano.

Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com os objetivos de verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de basidiocarpo, de micélio e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* contra *C. lindemuthianum*, através de ensaios de inibição de germinação de esporos e crescimento micelial, bem como verificar o efeito destes na indução de resistência do feijoeiro a esse patógeno e o envolvimento de enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e  $\beta$ -1,3-glucanase e das espécies reativas de oxigênio peróxido de hidrogênio e superóxido neste processo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies englobados como feijão nas estatísticas da FAO, este envolve cerca de 107 países produtores em todo o mundo. Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos. Mesmo o aumento de 48% na produtividade, verificado neste período, ainda resultou numa diminuição de 4% na produção, portanto, não sendo suficiente para atender a demanda (YOKOYAMA, 2003).

O feijão é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro, por ser reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e de ser rico em ferro (BORÉM & CARNEIRO, 1998).

A produção nacional de feijão para a 1ª safra em 2007 foi de 1.799.352 ton, em uma área de 2.302.497 ha, resultando em produtividade de 781 kg/ha, valores estes 7%, 14% e 6% maiores, respectivamente, que os observados para a safra 2006. Para a 2ª safra, a produtividade foi de 812 kg/ha em uma área de 1.422.968 ha. Em 2007, a região Sul foi responsável por 47,5% da produção nacional, seguida pelas regiões Sudeste (21,7%) e Nordeste (20,3%). Na região Sul o Paraná é o principal estado produtor, com 31% da produção nacional (IBGE, 2007).

## **2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO**

A cultura do feijoeiro, em todas as regiões do mundo onde é praticada, pode ser afetada por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides (SARTORATO et al., 1996).

As doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil. Muitas doenças podem causar, dependendo das condições de ambiente, danos totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 1998).

### **2.2.1 Antracnose – *Colletotrichum lindemuthianum* Lams-Scrib**

A antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Lams-Scrib, é considerada uma das doenças mais graves que atingem a cultura do feijoeiro no Brasil, uma vez que pode ocorrer em toda a parte aérea da planta e, ao encontrar condições favoráveis, causar danos de até 100% na produção. Esta doença é de distribuição ampla. No Brasil ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba (DALLA PRIA et al., 1999). Segundo Bianchini et al. (2005), é uma doença cosmopolita, ocorre em locais de temperatura baixa a moderada e alta umidade.

Alem de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas no grão, tornando-o impróprio para o consumo (RAVA & SARTORATO, 1994).

### 2.2.1.1 Sintomatologia

Os sintomas típicos desta doença são lesões necróticas de coloração marrom-escura nas nervuras na face inferior da folha. Às vezes estas lesões podem ser vistas na face superior das folhas, quando então uma região clorótica desenvolve-se ao lado das manchas necróticas e as folhas tendem a curvar-se para baixo. Em ataques severos as lesões estendem-se ao limbo foliar ao redor das áreas afetadas nas nervuras, resultando em necrose de parte do tecido foliar (BIANCHINI et al., 2005)

Lesões produzidas no caule e nos pecíolos são alongadas, escuras e às vezes deprimidas. Nas vagens, são geralmente circulares e deprimidas, de coloração marrom, com os bordos escuros e salientes, circundado por um anel pardo-avermelhado. As lesões nas vagens podem ainda apresentar o centro de coloração mais clara ou rosada, devido à esporulação do fungo. As lesões podem coalescer e cobrir parcialmente as vagens. Sementes infectadas são geralmente descoloridas e podem apresentar lesões levemente deprimidas e de coloração marrom (DALLA PRIA et al., 1999). Alguns desses sintomas podem ser observados na Figura 1.

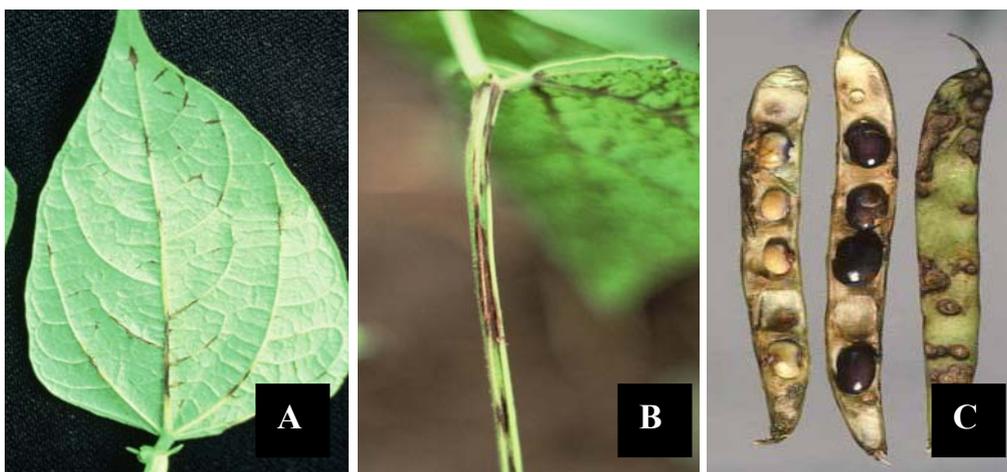


Figura 1. Lesões causadas por antracnose em folha (A), haste (B) e vagem (C).  
Foto: Marcio Paulo Czepak.

### 2.2.1.2 Etiologia

A antracnose do feijoeiro é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. A fase perfeita corresponde ao ascomiceto *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld & Scherenk f. sp. *phaseoli*. Esse fungo é patogênico também a outras espécies de leguminosas como *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (BIANCHINI et al., 2005).

O fungo produz micélio septado e ramificado, de coloração hialina a quase negra, à medida que envelhece. Os conídios são hialinos, unicelulares, podendo ser oblongos, cilíndricos, com pontas arredondadas ou uma delas pontiaguda. Os conídios medem de 2,5 - 5,5 x 11-20 µm e podem apresentar uma área clara semelhante a um vacúolo central. A massa de esporos formada nos acérvulos possui coloração rósea ou salmão. Os conidióforos são hialinos, eretos, sem ramificações, com comprimento de 40 a 60 µm. Os acérvulos são providos de setas que desenvolvem-se sobre uma massa estromática. As setas podem, às vezes, ser encontradas no hospedeiro e quase sempre em meio de cultura. Apresentam dimensões de 4-9 x 30-100 µm, são marrons e septadas (RAVA & SARTORATO, 1994).

*C. lindemuthianum* apresenta grande variabilidade patogênica, com mais de 32 raças já identificadas no Brasil (DALLA PRIA et al., 1999).

### 2.2.1.3 Epidemiologia

O fungo sobrevive em restos de cultura, mas sementes contaminadas constituem sua via de sobrevivência e disseminação mais importante. A doença é favorecida por temperaturas entre 13 e 27 °C, com ótimo a 21 °C e umidade relativa acima de 91%. Os conídios germinam em 6 a 9 h sob condições favoráveis, formam tubo germinativo, apressório e penetram mecanicamente pela cutícula e epiderme do

hospedeiro. O aparecimento dos sintomas ocorre a partir de 6 dias após o início da infecção (BIANCHINI et al., 2005).

Os conídios se prendem à superfície do hospedeiro pela sua camada gelatinosa. A pressão mecânica exercida pelo apressório faz com que a penetração ocorra pela cutícula e epiderme. Hifas infectivas incham e crescem entre a parede celular e o protoplasto durante 2-4 dias, sem causar danos aparentes às células do hospedeiro. Após vários dias as células da parede são degradadas enzimaticamente, levando ao surgimento de lesões aquosas que escurecem devido à alta concentração de taninos. O micélio se agrega dentro das lesões, formando acérvulos, que rompem a cutícula do hospedeiro. Os conídios são formados dentro de uma matriz gelatinosa e servem como inóculo para infecções secundárias (DALLA PRIA et al., 1999).

Além da temperatura, o molhamento foliar é outro fator essencial para que o processo de infecção e, conseqüentemente, a doença se desenvolvam. É necessário um determinado período de molhamento logo após a deposição dos conídios sobre as plantas para que ocorra a infecção. Período de molhamento foliar entre 18 e 24 horas acarreta acentuado aumento de tecido doente. O período mínimo de umidade para que o processo de infecção por *C. lindemuthianum* se inicie se situa entre 5 e 6 horas de molhamento foliar (BIANCHINI et al., 2005).

#### **2.2.1.4 Controle**

O controle da antracnose do feijoeiro comum pode ser alcançado pelo uso de práticas culturais, de produtos químicos e da resistência varietal (RAVA & SARTORATO, 1994).

O uso de sementes livre do patógeno é fundamental no controle de doenças, já que existe uma correlação positiva entre a incidência do fungo nas sementes e a porcentagem de plântulas com sintomas de antracnose. A rotação de culturas, por no mínimo um ano, deve ser feita para evitar a ocorrência da doença no plantio seguinte e

a perpetuação do fungo na área. Restos de cultura infestados devem ser eliminados do campo (BIANCHINI et al., 2005).

Deve-se evitar o trânsito dentro da lavoura nas primeiras horas do dia quando as plantas estão molhadas com orvalho, pois isto favorece a disseminação do patógeno. A escolha da época de plantio deve levar em conta o histórico da ocorrência da doença na região, evitando-se épocas de muita umidade associada com temperaturas baixas (DALLA PRIA et al., 1999).

O uso de variedades resistentes é outra medida importante que tem contribuído para reduzir os danos causados pelo patógeno. No entanto, a grande variabilidade patogênica apresentada por *C. lindemuthianum* dificulta a obtenção de variedades com resistência durável (BIANCHINI et al., 2005).

Segundo Assi (2005), as constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos pesquisadores a investigar algumas alternativas visando redução do uso de fungicidas com resultados promissores no controle de fitopatógenos em diversas culturas. O uso de extratos de microrganismos e produtos oriundos do seu metabolismo é uma prática que vem sendo bastante pesquisada em alguns patossistemas. O autor afirma através de sua pesquisa que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* podem controlar a antracnose causada por *C. lindemuthianum* em feijoeiro.

### **2.3 CONTROLE DE DOENÇAS**

As doenças de plantas têm representado problemas ao homem desde que este iniciou o cultivo de espécies alimentícias, quando a agricultura passou ao status de atividade essencial à vida humana, tendo sido despendidos enormes esforços na busca por combatê-las sobretudo ao longo dos últimos séculos (SOBRINHO et al., 2005).

Para o controle de doenças tem sido empregado basicamente o uso de fungicidas em função de ser método prático e alcançar bons resultados em curto prazo. No entanto, pode deixar resíduos químicos que podem ser prejudiciais ao homem, animais e

ambiente e ainda podem selecionar populações dos patógenos insensíveis a estes produtos (GHINI & KIMATI, 2000). Mas, a agricultura agroecológica visa a produção de alimentos sem resíduos e sem danos ao meio ambiente, tornando necessário a utilização de produtos alternativos, que sejam eficientes no controle de doenças (STANGARLIN et al., 1999).

### **2.3.1 Controle alternativo de doenças**

Antes das atuais facilidades para aquisição de agroquímicos para o controle de problemas fitossanitários, os agricultores utilizavam produtos obtidos nas proximidades de suas propriedades, ou mesmo, apenas dentro delas. Com a popularização do uso de agroquímicos, aqueles produtos foram quase que totalmente abandonados e, hoje, muitos deles são chamados de alternativos. Devido à conscientização dos problemas causados pelos agroquímicos para o ambiente, a sociedade vem exigindo a redução de seu uso, de forma que a pesquisa vem testando os mais diversos produtos, muitos deles já utilizados pelos agricultores em décadas passadas (BETTIOL, 2004).

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo através da ação direta de outro microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK & BAKER, 1983). A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos latentes de defesa das plantas contra fitopatógenos através da ação de moléculas indutoras ou eliciadoras (CAVALCANTI et al., 2005a).

### **2.3.1.1 Indução de resistência**

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

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

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

### **2.3.1.2 Indutores de resistência**

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

relacionadas à patogênese como  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (PASCHOLATI & LEITE, 1995; CAVALCANTI et al., 2005b). Moléculas de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar/induzir qualquer resposta de defesa nas plantas, são chamadas de elicitores. Entre os elicitores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (compostos secundários) com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), bem como os extratos obtidos de cogumelos (DI PIERO et al., 2005).

A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI & LEITE, 1994). Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias, pré-formados (presentes na planta antes do contato com o patógeno) e pós-formados (produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno). Segundo Pascholati & Leite (1995) cada grupo de mecanismo compreende, por exemplo:

- Pré-formados (passivos; constitutivos):
  - estruturais: espessamento de cutículas, densidade de tricomas, densidade e conformação de estômatos, deposição de fibras e lignina em vasos condutores;
  - bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fitoalexinas.
- Pós-formados (ativos; induzíveis):
  - estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses;
  - bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese.

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

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP) são responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa vegetal a fitopatógenos (STINTIZI et al., 1993). Como conceito geral, pode-se dizer que as proteínas RP são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, e podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno (LINTHORST, 1991).

De acordo com Stintizi et al. (1993), a reação de hipersensibilidade é um dos mais eficientes mecanismos de defesa, onde há a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta.

Vários estudos têm apontado o acibenzolar-S-metil (ASM) como um dos mais promissores indutores de resistência vegetal. Após alguns anos de pesquisas, o desenvolvimento dessa molécula permitiu a obtenção de um indutor lançado comercialmente no mercado sob as marcas Bion<sup>®</sup> e Actigard<sup>®</sup>, constituindo-se no primeiro representante de uma nova geração de protetores de plantas eficientes na indução de resistência (LYON & NEWTON, 1997).

#### **2.3.1.2.1 Peroxidase**

A enzima peroxidase (E.C. 1.11.1.7) e suas isoformas participam de vários processos fisiológicos de grande importância, catalisando a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina, um importante mecanismo físico de defesa vegetal (GASPAR et al., 1982). A peroxidase é uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa contra patógenos e regulação da elongação de células entre outras (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003).

As peroxidases apresentam várias funções na defesa celular, pela sua participação na lignificação, suberização e metabolismo de parede celular (KHUN, 2007), sendo classificadas por Van Loon & Van Strein (1999) como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas – PR) pertencentes a família PR-9. O funcionamento básico das peroxidases consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxila anelado a um anel aromático. A reação clássica destas enzimas é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (*o*-metoxi-fenol) que resulta na formação de radicais fenoxi, sendo que a subsequente ligação de radicais instáveis leva a polimerização não enzimática de monômeros e de maneira similar, hidroxicinamil álcool e seus derivativos são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, bem como o ácido hidroxicinâmico, contendo grupos funcionais alifáticos, é convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001).

A formação e subsequente depósito de lignina junto às paredes celulares das plantas poderia contribuir para seu fortalecimento, constituindo-se em uma barreira física em resposta ao ataque de patógenos (STINTIZI et al., 1993), a qual pode afetar o desenvolvimento fúngico por bloquear fisicamente o crescimento do patógeno, reduzir a difusão de nutrientes para o fungo ou a peroxidase levar à síntese de precursores de lignina tóxicos ao fungo (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004). Por outro lado, a produção de espécies ativas de oxigênio pela ação catalítica das peroxidases poderia resultar na ativação de outras respostas de defesa em plantas (STINTIZI et al., 1993).

Mudanças na atividade das peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (BONATTI et al., 1994). Com relação à biossíntese de lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanóides, as peroxidases são responsáveis pela remoção dos átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina. Esse polímero, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração do patógeno. A lignificação pode impedir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais através de várias maneiras: a) estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e ao

crescimento do patógeno; b) modificação da parede celular tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; c) aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Na indução de resistência as peroxidases são bastante estudadas devido a sua importância no processo de defesa, e na maioria dos casos o aumento da atividade está diretamente relacionado com a redução da severidade da doença (KUHN, 2007). A ativação das formas latentes de peroxidase, após a destruição ou inativação de inibidores protéicos ou fenólicos, pode conduzir à indução de síntese de isoformas de peroxidase (BIRECKA et al., 1973).

Iriti & Faoro (2003), trabalhando com feijoeiro induzido com ASM, demonstraram redução de 100% na ocorrência de ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* e, em testes histológicos, a presença de alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evidenciando alta atividade de peroxidase nas plantas que expressaram resistência.

#### **2.3.1.2.2 Polifenoloxidase**

Polifenoloxidases (PFO) (E.C. 1.10.3.1) 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 monofenóis, constituindo atividade de monofenolase (MAYER & HAREL, 1979; VAUGHN & DUKE, 1984). São também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002). Estas enzimas estão amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, sendo encontradas também em várias espécies de bactérias, numerosos fungos e algas, porém não em algas unicelulares (FLURKEY, 1989; Mayer & Harel, 1979).

As polifenoloxidases permanecem intracelularmente, em sua grande maioria em estado inativado, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos,

separadas dos compostos fenólicos, que também estão compartimentalizados nos vacúolos, no entanto, pequena parte pode estar extracelularmente na parede celular (MAYER & HAREL, 1979; VAUGHN et al., 1988). Na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por fermento, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência, as PFO são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos (CONSTABEL et al., 1995; MOHAMMADI & KAZEMI, 2002; THIPIYAPONG et al., 2004).

A quantidade de polifenoloxidasas geralmente é elevada em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência. A importância da atividade das polifenoloxidasas na resistência a doenças, deve-se, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento. Por esta razão, admite-se que um aumento na atividade das polifenoloxidasas resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação e, portanto, maior grau de resistência à infecção (AGRIOS, 1997). Em plantas, as polifenoloxidasas têm sido associadas também à lignificação, além de ser um fator na proteção de plantas injuriadas contra outros organismos invasores, pela ação tóxica de quinonas reativas produzidas a partir da catálise de compostos fenólicos (MAYER & STAPLES, 2002).

No processo de defesa celular, a principal ação das quinonas é como fator antinutritivo na alimentação de insetos, onde taninos na forma fenólica são oxidados a quinonas apresentando alta reatividade com as proteínas da dieta do inseto, impedindo que este possa digerir-las (TAIZ & ZEIGER, 2004). A ação contra fitopatógenos ocorre após a penetração, quando a enzima é liberada dos tilacóides, após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos produzindo quinonas (THIPIYAPONG et al., 2004).

Iurkiv et al. (2007) verificaram que plantas de rúcula tratadas com indutores bióticos (fermento Fleischmann, Dipel, Floratil e Agro-Mos) e inoculadas com *Albugo candida* apresentaram incremento na atividade específica de polifenoloxidase em

relação ao tratamento água, assim como Eckstein et al. (2007) verificaram que no mesmo patossistema quando tratado com indutores abióticos (Bion e Ecolife), também houve indução da atividade específica de polifenoloxidase.

### 2.3.1.2.3 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) (E.C. 4.3.1.5) é a primeira enzima do metabolismo de fenilpropanóide na maioria das plantas e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta à infecções (STRACK, 1997). É a enzima 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-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres (CAVALCANTI et al., 2005b).

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).

A FAL difere das polifenoloxidases e peroxidases visto atuar sobre substrato específico, a fenilalanina. Desse modo, aparentemente, não haveria a necessidade de isoformas para atuar em substratos variáveis. No entanto, a FAL é codificada por múltiplos genes, evidenciando o grau de importância para a planta, podendo ter múltiplas combinações entre os monômeros da enzima, cuja combinação estaria em função do estímulo indutor e que direcionaria para a produção de um produto final específico (DIXON & PAIVA, 1995).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de numerosos compostos fenilpropanóides que realizam várias funções essenciais na planta (RITTER & SCHULZ, 2004). Dentre estas funções destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina

(DIXON & PAIVA, 1995; WHETTEN & SEEDEROFF, 1995), as substâncias que atuam como protetores contra estresses abióticos como os antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV, ou proteção contra estresses bióticos como a ação de fitopatógenos pela síntese de compostos como fitoanticipinas e ação de insetos mastigadores pela síntese de compostos fenólicos como fatores antinutritivos (DIXON & PAIVA, 1995).

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

Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com ácido salicílico (AS) e um isolado de *Colletotrichum lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade de fenilalanina amônia-liase, porém a magnitude desta atividade variou em função do cultivar.

#### **2.3.1.2.4 $\beta$ -1,3-glucanase**

As  $\beta$ -1,3-glucanases (E.C. 3.2.1.39) são endoglucanases e monômeros com massa molecular entre 25-35 kDa e que produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina (uma  $\beta$ -1,3-glucana). A  $\beta$ -1,3-glucana é um importante componente da parede celular de muitos fungos (BOL et al., 1990).

As  $\beta$ -1,3-glucanases apresentam atividade antifúngica amplamente demonstrada por ensaios *in vitro* e *in vivo*, sugerindo uma função na defesa de plantas contra doenças (STICHER et al., 1997; FRITIG et al., 1998). A atividade antimicrobiana destas enzimas, presentes em plantas é decorrente, possivelmente, de sua ação catalítica na hidrólise do polímero de  $\beta$ -1,3-glucana, componente estrutural da parede celular de muitos fungos. Sua ação catalítica, particularmente na extremidade de

hifas onde a glucana está mais exposta, acarreta um enfraquecimento da parede, resultando na lise e morte celular de fitopatógenos (FRITIG et al., 1998). O acúmulo e a síntese de  $\beta$ -1,3-glucanases em tecidos vegetais têm sido frequentemente associados aos mecanismos de defesa de plantas contra doenças, uma vez que podem ser desencadeados por patógenos, metabólitos provenientes de microrganismos ou substâncias químicas que agem como indutores de resistência (ROULIN & BUCHALA, 1995).

Xue et al. (1998) induziram resistência em feijoeiro a partir da inoculação com *Rhizoctonia* binucleada não patogênica e, a presença do fungo aumentou a atividade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase associado a proteção de 80 % contra *Rhizoctonia solani* e de até 100 % contra *Colletotrichum lindemuthianum*.

Dann et al. (1996) induziram resistência em feijoeiro com ácido naftaleno acético na 1ª folha verdadeira e observaram aumento na atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase tanto nesta folha quanto no 2º trifólio.

#### **2.3.1.2.5 Espécies reativas de oxigênio (EAO's)**

A explosão oxidativa é uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno. Essa resposta corresponde à geração de espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e  $OH^-$ ). São recentes os estudos de detecção e monitoramento destas espécies de oxigênio, devido à grande variedade de formas e intermediários, além da alta taxa de reatividade química envolvida nessas reações, dificultando os estudos (RESENDE et al., 2003).

De acordo com Resende et al. (2003), as ERO's em geral, são apontadas como intermediárias na complexa malha de sinalização para as respostas de resistência local (reação de hipersensibilidade) e sistêmica (resistência sistêmica adquirida). Segundo o mesmo, a explosão oxidativa não está confinada à reação macroscópica de hipersensibilidade no sítio de inoculação, pois repetidas explosões secundárias ocorrem

em sítios discretos em tecidos distantes, provocando micro-reações de hipersensibilidade e reação sistêmica (resistência sistêmica adquirida).

Segundo Baker & Orlandi (1999), as espécies reativas de oxigênio (ERO's) ocorrem durante o contato inicial entre o patógeno e a célula vegetal, mas podem também ser produzidas e apresentar um papel sutil nos estádios posteriores da patogênese. Durante a interação planta-patógeno a produção de ERO's acontece em três fases: na fase I ocorre o reconhecimento dos elicitores provenientes do patógeno que podem ser carboidratos, proteínas ou porções de glicoproteínas. Esse reconhecimento dispara os eventos de transdução de sinais. Durante a fase II são iniciados vários processos relacionados à defesa, mas não identificados por sintomas visíveis. Os processos ou vias metabólicas dessa fase são resultantes do reconhecimento durante a fase I, e nesses processos de defesa incluem-se aumento de antioxidantes, ação de lipoxigenases, a reação de hipersensibilidade (HR), produção de fitoalexinas, lignificação e resistência sistêmica adquirida (SAR). A fase III compreende o processo de evolução da patogênese. A separação em três fases distintas é apenas um artifício para compreensão de como ocorrem tais processos. Na natureza, dependendo das interações, ocorrerá uma sobreposição dos eventos fisiológicos. De acordo com Cavalcanti et al. (2005b), as espécies reativas de oxigênio podem atuar de diferentes maneiras durante a resposta de resistência da planta, sendo elas:

- Diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento;
- Fortalecendo a parede celular, por favorecer as ligações cruzadas com proteínas extratruais;
- Pela peroxidação de lipídios da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade, devido à redução de sua fluidez;
- Pela regulação da expressão de genes requeridos para a ativação da resistência ou pela formação de ácido jasmônico, um mensageiro secundário. Nesse caso, quem atua é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a espécie reativa de oxigênio mais estável e prontamente transportada através da membrana.

As seguintes espécies reativas de oxigênio podem ser geradas (Heiser & Osswald, 2004):

*Singlet oxygen* ( $O_2$ ): o *singlet oxygen* possui o mesmo número de elétrons que a forma mais estável, mas os elétrons  $\pi^*$  têm órbitas antiparalelas. Entretanto, o *singlet oxygen* é capaz de reagir com outras moléculas induzindo a oxidação das mesmas;

Radical superóxido ( $O_2^-$ ): o radical ou ânion superóxido (ou apenas superóxido) representa o produto da redução de um elétron do  $O_2$ ;

Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ): uma redução bivalente do oxigênio conduz à formação do peróxido de hidrogênio, o qual também pode ser formado durante a ação de dismutase do superóxido;

Radical hidroxil (OH): uma posterior redução do peróxido de hidrogênio conduz à produção do radical hidroxil, o qual é uma espécie muito agressiva de oxigênio.

Na sinalização para respostas de defesa da planta ao patógeno, o  $H_2O_2$ , é o candidato mais atrativo dentre as ERO's, por causa da sua vida relativamente longa e alta permeabilidade através das membranas. Como o  $H_2O_2$  não possui elétron pareado, pode atravessar membranas biológicas, nas quais as espécies de  $O_2^-$  atravessam lentamente. Desse modo, após o reconhecimento do patógeno avirulento seguido da explosão oxidativa e seus intermediários reativos, ocorre indução de genes de defesa e morte celular, onde o  $H_2O_2$  age como um sinal para indução de genes de proteção celular nas células vizinhas para restringir o desenvolvimento da lesão (HR), que é, então acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida. Essa reação sistêmica de defesa é induzida pela explosão oxidativa no sítio de inoculação (local primário), e pelas subseqüentes microexplosões secundárias em folhas distantes, que por sua vez são necessárias para o estabelecimento da SAR (RESENDE et al., 2003).

Para Resende et al. (2003), a explosão oxidativa é necessária mas não suficiente para disparar a morte celular (reação de hipersensibilidade). Dados citados por Delledone et al. (2001) indicam que o óxido nítrico (NO) coopera com as ERO's na ativação da reação de hipersensibilidade, então, aparentemente o NO possui um efeito sinérgico com o  $H_2O_2$ , na indução de reação de hipersensibilidade. A explosão

oxidativa participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização, que envolve o ácido salicílico e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico no disparo dos mecanismos de defesa (LAMB & DIXON, 1997). O desenvolvimento da reação de hipersensibilidade, inicialmente desencadeado pela presença de espécies reativas de oxigênio, promove o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (ALVAREZ et al., 1998).

Como o acúmulo de ERO's pode resultar em prejuízos consideráveis, a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar eficientemente essas espécies reativas de oxigênio. Esses mecanismos de proteção foram desenvolvidos pelas plantas durante o processo de evolução, para controlar os níveis dessas moléculas e anular essa toxicidade. Moléculas antioxidantes, enzimas simples e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na proteção celular contra ERO's acumuladas. Conhecidos como "scavengers", várias enzimas reguladoras impedem a ação tóxica das ERO's à célula vegetal (RESENDE et al, 2003).

As ERO's são difíceis de serem detectadas diretamente por métodos espectrofotométricos ou HPLC. Por isso, a maioria das técnicas de detecção baseia-se na oxidação ou redução de certos compostos pelas ERO's (RESENDE et al., 2003). Alguns métodos de detecção de ERO's em plantas podem ser: macroscópico/microscópico (com *nitroblue tetrazolium*, amido/iodeto de potássio e cloreto de titânio); espectrofotométrico (com *nitroblue tetrazolium*, citocromo C e epinefrina); fluorescente (com piranina e escopoletina) e quimioluminescente (com luminol e lucigenina) (BAKER & ORLANDI, 1999).

Beltrame et al. (2006) verificaram que algas eucarióticas e cianobactérias estimularam o acúmulo local e sistêmico de superóxido em plantas de fumo inoculadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV), em relação aos controles água, meio de cultivo BG11 ou acibenzolar-S-metil.

Stangarlin et al. (2005) detectaram que em folhas de tomateiro, após 144 h de inoculação com *Alternaria solani*, houve colapso das células da epiderme que tornaram-se progressivamente marrons, como resposta por melanização e formação de taninos devido a morte do tecido pela anterior explosão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Observaram também a formação de  $\text{O}_2^-$  em células do cloroplasto e nas regiões intercelulares.

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

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

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

Fiori-Tutida (2003) verificou através dos extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, potencial como eliciadores de respostas de defesa em plântulas, uma vez que estimularam a produção de fitoalexinas em soja e sorgo, indução de proteínas – PR ( $\beta$ -1,3-glucanase e peroxidase) em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de sorgo. Porém observou que estes extratos não apresentaram efeito antimicrobiano direto, tanto no crescimento micelial, como na germinação de esporos do patógeno *Bipolaris sorokiniana*.

Trabalhos realizados por Shukla et al. (1996), Assi (2005), e também por Toillier et al. (2007), demonstraram o potencial de *P. sanguineus* no controle de fitopatógenos.

### 2.3.2.1 *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr

*Pycnoporus sanguineus* é um fungo do tipo saprófita de crescimento lento, pertencente a Divisão *Basidiomycota*, da família Poliporaceae, responsável pela decomposição de certos tipos de madeiras nas florestas e destacando-se pela cor vermelho-alaranjada de seus basidiocarpos (NOBLES & FREW, 1962) (Figura 2).

Zulfadhy et al. (2001) indicaram o uso desse fungo para remoção de metais pesados fixados na coluna do leito de rios. Além disso, a presença de compostos como ligninase, Mn-peroxidase e  $\beta$ -glucosidade, indica-o como potencial para uso industrial.

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

Pazuch (2007) verificou que extratos aquosos de basidiocarpos, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. Meinerez et al. (2007) verificaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* apresentam potencial indutor de resistência em cotilédones de soja, através da produção de fitoalexinas e incremento na atividade de peroxidase.

Beninca (2007) avaliou três soluções orgânicas de *P. sanguineus* (hexânica, etanólica e diclorometânica) em diferentes concentrações e verificou que extrato exânico ( $750 \text{ mg L}^{-1}$ ) e etanólico ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) tiveram atividade elicitora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.



Figura 2 – Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Foto: Mauricele Baldo

#### 2.3.2.2. Potencial de *P. sanguineus* no controle de doenças de plantas

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

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

Toillier et al. (2007) verificaram que extrato aquoso de micélio de *P. sanguineus* estimulou o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, enquanto extratos aquosos de basidiocarpo e de filtrado da cultura de *P. sanguineus* reduziram o crescimento da bactéria.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE *C. lindemuthianum***

O patógeno foi isolado a partir de lesões em folhas de feijoeiro infectadas naturalmente com *C. lindemuthianum* coletadas no município de Marechal Cândido Rondon. O fungo foi multiplicado e cultivado em meio ágar-vagem (RAVA & SARTORATO, 1994).

#### **3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *P. sanguineus***

##### **3.2.1 Extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus***

A obtenção do extrato bruto foi adaptada da metodologia de Assi (2005). Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados na região Oeste do Paraná e, posteriormente, secos em temperatura constante de 30 °C e moídos em moinho de facas. O preparo dos extratos aquosos (EA) constituiu na hidratação do pó seco de basidiocarpos por 24 h a temperatura de 4 °C, na proporção de 14 mL de água destilada para 1 g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004; DI PIERO et al., 2006). Os filtrados coletados foram submetidos a uma nova filtragem de esterilização em sistema Millipore com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro. Esses filtrados foram armazenados em geladeira a 4 °C e após diluições para se obter as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20%, foram utilizados nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

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

Foram preparados 100 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose) e autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 min, para onde foram repicados cinco discos contendo meio de cultura mais micélio de *P. sanguineus*, crescido por 14 dias em meio BDA e escuro a 25 °C. Os frascos foram mantidos em escuro sob temperatura de  $\pm 25$  °C, sob agitação (100 rpm) (PAZUCH, 2007). Após vinte dias, foi filtrado o conteúdo de cada frasco em papel filtro Whatman n° 1. O micélio retido no filtro foi colocado em estufa a 40 °C até obtenção de peso constante. O micélio foi macerado e posteriormente hidratado na proporção de 14 mL de água destilada para 1 g de micélio seco, durante 24 h à 4 °C. Após hidratação foi submetido à filtração em papel filtro Whatman n° 1 seguido de esterilização em sistema Millipore com membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. Em seguida foi diluído em água para se obter as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20% e posteriormente utilizado nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

### **3.2.3 Extrato do filtrado da cultura de *P. sanguineus***

Foi utilizado o filtrado de cultura de *P. sanguineus* obtido em 3.2.2, o qual foi submetido à uma nova filtração de esterilização em sistema Millipore com membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, diluído para se obter as concentrações 1, 5, 10, 15 e 20% e, posteriormente, utilizado nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

### 3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 3.3.1 Inibição de germinação de esporos

Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos de *C. lindemuthianum* ( $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) obtidos de cultura com 14 dias de idade, e outra de 40  $\mu\text{L}$  das concentrações dos extratos de basidiocarpo, de micélio, filtrado de cultura e meio batata-dextrose autoclavado, corrigidas para se manter as concentrações finais de 1, 5, 10, 15 e 20%, além dos controles água destilada, azoxystrobin (4 g i. a.  $\text{L}^{-1}$ ) e acibenzolar-S-metil (75 mg i. a.  $\text{L}^{-1}$ ), foram colocadas juntas em lâmina de microscopia revestida por uma camada delgada de ágar-água (2%) (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994). Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C e, após 24 horas, foi adicionada alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de azul algodão de lactofenol em cada parcela, a fim de paralisar a germinação dos esporos. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo (BERGAMIN FILHO, 1995). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento.

#### 3.3.2 Inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*

Em erlenmeyer contendo 100 mL de BDA, foram adicionadas alíquotas dos extratos brutos de basidiocarpo, filtrado e micélio de *P. sanguineus* de modo a se obter concentrações finais de 1, 5, 10, 15 e 20%. Em seguida este material foi submetido a autoclavagem à 121 °C e 1 atm, durante 20 min. O meio foi vertido em placas de Petri e um disco de micélio (0,5 cm de diâmetro) de *C. lindemuthianum*, retirado de uma cultura com 19 dias de idade, foi repicado para o centro das placas, ficando estas em 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Como tratamentos controle foram utilizados o meio BDA autoclavados (ASSI, 2005), e meio BDA autoclavado com posterior adição de

acibenzolar-S-metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e BDA autoclavado com posterior adição de azoxystrobyin (4 g i.a. L<sup>-1</sup>).

Foram utilizadas três repetições para cada tratamento. As avaliações foram efetuadas a cada três dias, medindo-se o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) até o momento em que o fungo atingiu 2/3 da placa, sendo este um período de 15 dias.

### 3.4 ENSAIO *IN VIVO*

Sementes de feijoeiro IAPAR 81 (Carioca) foram semeadas em vasos com capacidade para 1,5 L contendo mistura de solo + areia + esterco bovino curtido (2:1:2). Foram cultivadas duas plantas em cada vaso, estas mantidas em casa de vegetação, até o momento da inoculação, localizada no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Professor Dr. Mário César Lopes, da Unioeste, campus de Marechal Cândido Rondon/PR, localizada a 24°33'40" de latitude sul, 54°04'00" de longitude oeste, e altitude média de 400 m.

### 3.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Para os ensaios de indução de resistência a *C. lindemuthianum* foram realizados os tratamentos: a) testemunha ou controle negativo: plantas tratadas com água destilada; b) controle positivo 1: fungicida sistêmico azoxystrobin (4 g i. a. L<sup>-1</sup>); c) controle positivo 2: acibenzolar-S-metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>); d) extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus* (5 e 10%); e) extrato do micélio de *P. sanguineus* (5 e 10%) e f) extrato do filtrado da cultura de *P. sanguineus* (5 e 10%). Os extratos foram aplicados três dias antes da inoculação do patógeno. Os extratos foram aplicados na primeira folha trifoliada.

A suspensão de esporos foi preparada com isolado de *C. lindemuthianum*, com 15 dias de cultivo em meio ágar-vagem, em água com Tween 20 (uma gota / 100 mL), sendo a concentração ajustada para  $1 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A inoculação foi realizada via aspersão. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polipropileno (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000) e mantidas em luz constante por 24 h a 20 °C. Após esse período a câmara úmida foi removida e as plantas ficaram nas condições de laboratório, sob luz fluorescente constante e temperatura de 20 °C (variação de 5 °C) até conclusão do experimento.

A inoculação do patógeno foi realizada na primeira folha trifoliada tratada, bem como na segunda folha trifoliada não tratada, para se observar a ocorrência de proteção local e/ou sistêmica, respectivamente.

A avaliação de severidade foi realizada a cada três dias utilizando escala diagramática elaborada por Dalla Pria et al. (1999) (Figura 3).

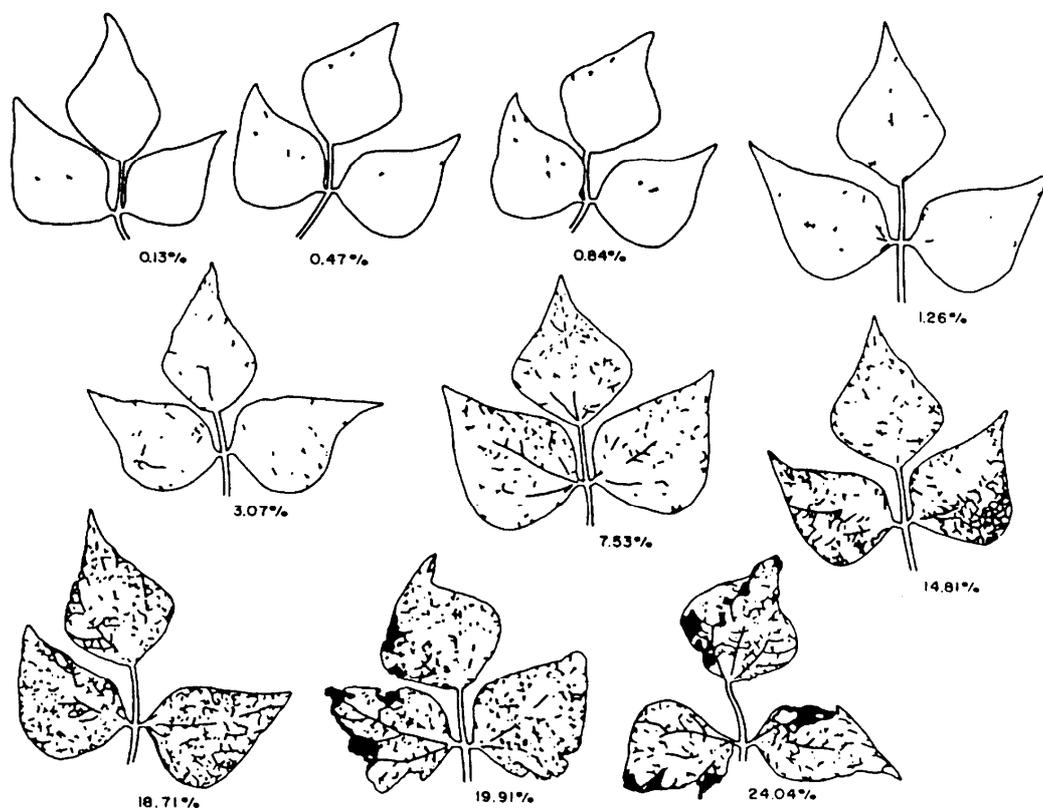


Figura 3. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro . Fonte: Dalla Pria et al. (1999).

### **3.5.1 Coleta de amostras para análise bioquímica**

Discos de folha com 3,46 cm<sup>2</sup> das plantas foram coletados no momento dos tratamentos e também no 3°, 6°, 9° e 12° e 27° dias após. Durante o procedimento de amostragem, cada amostra coletada foi imediatamente pesada e acondicionada em envelope de papel alumínio e congelada. Foram coletadas amostras nas 1<sup>as</sup> folhas trifoliadas inoculadas, bem como nas 2<sup>as</sup> folhas trifoliadas não-inoculadas de plantas infectadas.

### **3.5.2 Análises bioquímicas da resistência**

#### **3.5.2.1 Obtenção do extrato protéico**

As amostras do tecido vegetal coletadas foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 6.500 g durante 10 min. O sobrenadante obtido, considerado como fração contendo as enzimas solúveis, foi congelado para posterior determinação da atividade enzimática. Todo o processo de extração foi conduzido a 4 °C (LUSSO & PASCHOLATI, 1999).

#### **3.5.2.2 Determinação da atividade de peroxidases**

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982).

O substrato da enzima constituiu da solução de 12,5 mL de guaiacol 2 % e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A

cubeta de referência constituiu de 3,0 mL do substrato. A mistura da reação continha 2,9 mL de substrato e 100  $\mu\text{L}$  da preparação enzimática. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm. Os resultados foram expressos em variação ( $\Delta = \text{delta}$ ) de unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A mistura da reação teve quatro réplicas, sendo que para cada réplica foram utilizados 800  $\mu\text{L}$  de preparação enzimática e 200  $\mu\text{L}$  de reagente o qual foi adicionado sob agitação. Após 5 min foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.5.2.3 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL)**

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006), sendo a mesma avaliada segundo metodologia descrita por Kuhn (2007). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 2 h, continha 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico (item 3.5.2.1), 400  $\mu\text{L}$  do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A reação foi paralisada com 60  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M. A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (esse controle correspondia a uma mistura de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

### 3.5.2.4 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3 glucanases

Esta atividade foi avaliada segundo metodologia descrita por Stangarlin et al. (2000). A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (HAPHB). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 1 h, continha 50  $\mu$ L de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0), 100  $\mu$ L do extrato protéico e 150  $\mu$ L de laminarina (2,0 mg / mL). Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL de uma solução de HAPHB (0,5 g dissolvidos em 20 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em gelo a leitura da absorbância das amostras foi determinada a 410 nm, sendo descontada a absorbância do controle (100  $\mu$ L do extrato protéico e 50  $\mu$ L do tampão de extração). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose, sendo os dados expressos em absorbância  $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

### 3.5.2.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase

A atividade das polifenoloxidases (PFO) foi determinada usando-se metodologia de Duangmal & Apeten (1999), adaptada por Kuhn (2007). O ensaio constituiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 980  $\mu$ L de substrato e 20  $\mu$ L do extrato enzimático (item 3.5.2). A temperatura da reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. O diferencial entre o aumento constante da leitura da absorbância foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

### 3.5.3 Localização *in situ* de espécies ativas de oxigênio

Plantas de feijão IAPAR 81 (Carioca) foram tratadas com extratos aquosos de micélio de *P. sanguíneus* (5%), basidiocarpo de *P. sanguíneus* (5%), azoxystrobin (4 g i. a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e água. Os extratos foram aplicados na primeira folha, três dias antes da inoculação do patógeno.

A inoculação do patógeno, com suspensão de  $1 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, foi realizada na primeira folha trifoliada tratada, bem como na segunda folha trifoliada não tratada, e após a inoculação as plantas foram mantidas em temperatura de  $\pm 25$  °C e em câmara úmida, durante todo o período de avaliação (192 h).

Os experimentos histoquímicos foram realizados 48, 96 e 192 h após inoculação. Três discos foliares de cada tratamento foram usados para as observações. As amostras processadas foram acondicionadas em lâminas de microscopia com azul algodão de lactofenol para observação microscópica.

#### 3.5.3.1 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A localização *in situ* do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adaptada das metodologias adotadas por Romero-Puertas et al. (2004) e Freyer et al. (2002). Foram cortados discos de tecidos foliares de 0,785 cm<sup>2</sup> tratados e inoculados, colocados submersos em solução de DAB (*Diaminobenzidine*) a 0,1% em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0). O corante DAB foi infiltrado em vácuo (90 mm Hg) durante dois períodos de 25 min cada. Posteriormente o tecido foi descolorado por imersão em álcool (96 °) aquecido a 60 °C. A formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada através de observação de precipitados de coloração marrom no tecido.

### 3.5.3.2 Superóxido ( $O_2^-$ )

A localização *in situ* do  $O_2^-$  foi adaptada das metodologias adotadas por Romero-Puertas et al. (2004) e Freyer et al. (2002). Foram cortados discos de tecidos foliares de  $0,785\text{ cm}^2$  tratados e inoculados, e colocados submersos em solução de NBT (*nitro blue tetrazolium*) a 0,1% em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0). O corante NBT foi infiltrado em vácuo (90 mm Hg) durante dois períodos de 25 min cada. Posteriormente o tecido foi descolorado por imersão em álcool (96 °) aquecido a 60 °C. A formação de  $O_2^-$  foi determinada através de observação de precipitados de coloração azul no tecido.

## 3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado para todos os ensaios. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, utilizando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para as comparações das médias, ou ainda análise de regressão quando pertinente. Foi utilizado o programa SANEST para o levantamento estatístico dos dados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENSAIO *IN VITRO*

#### 4.1.1 Inibição da germinação de esporos

A análise dos dados revelou que os 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%, sendo esta inibição muito próxima ao fungicida. Já na concentração 1%, apresentou inibição de 34% em relação ao controle água (Figura 4A).

Os extratos aquosos de micélio de *P. sanguineus*, em todas as concentrações avaliadas apresentaram efeito inibitório da germinação dos esporos quando comparados ao controle água, diferindo em até 40% deste (Figura 4B), no entanto, foi inferior à inibição causada por ASM e pelo fungicida.

Os extratos aquosos do filtrado de cultura de *P. sanguineus* inibiram a germinação de esporos semelhante ao fungicida, para todas as concentrações testadas (Figura 4C), o que indica seu potencial antimicrobiano à *C. lindemuthianum*, fato que pode estar associado a liberação de compostos antimicrobianos por *P. sanguineus* durante o período de cultivo.

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

Assi (2005) observou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* reduziram a germinação *in vitro* de esporos de *C. lindemuthianum*, alcançando inibições de até 96%. Vicelli et al. (2008) verificaram que extratos de micélio de *P.*

*sanguineus* a partir da concentração 5% inibiram significativamente a germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola*, enquanto extratos de basidiocarpos e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* não apresentaram efeito significativo.

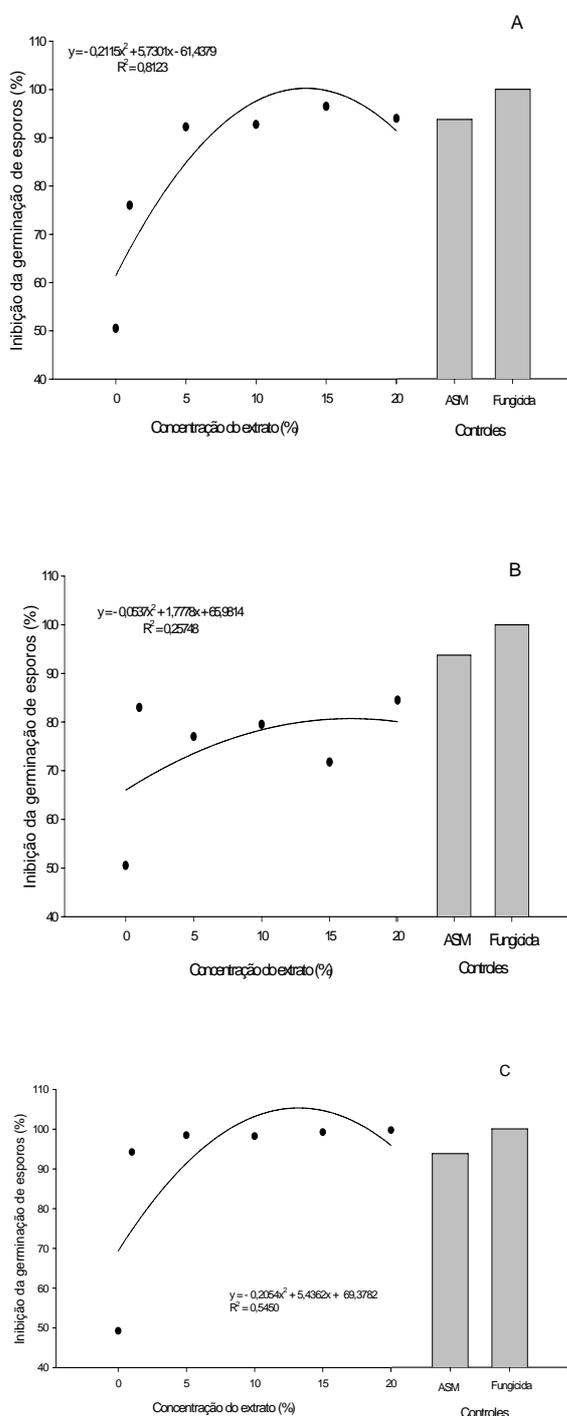


Figura 4 – Inibição da germinação de esporos de *C. lindemuthianum* na presença de extratos de basidiocarpos (A), micélio (B) e filtrado (C) de *P. sanguineus*. Controles: acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e azoxystrobin (4 g i.a. L<sup>-1</sup>).

#### 4.1.2 Inibição do crescimento micelial

Para todos os extratos e concentrações avaliadas, não se observou inibição nem indução do crescimento micelial em relação aos controles água e ASM. Porém, o fungicida inibiu o crescimento micelial em até 85% quando comparado aos demais tratamentos (Figura 5). Dados estes que diferem dos obtidos por Assi (2005), onde os extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* estimularam o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em até 48% quando comparados ao controle água. Toillier et al. (2007) testaram extratos aquosos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus* no controle *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, e observaram que o extrato do micélio estimulou o crescimento da bactéria de forma dose-dependente, o extrato do filtrado apenas a 20% reduziu em 21% o crescimento bacteriano, e que o extrato de basidiocarpo em 15 e 20% reduziu 91% em média o crescimento bacteriano, enquanto Viecelli et al. (2008) observaram que extrato aquoso de micélio de *P. sanguineus* a 20% não inibiu o crescimento micelial de *Pseudocercospora griseola* quando comparado ao fungicida azoxystrobin, porém este extrato a 15% foi tão fungitóxico quanto o ASM.

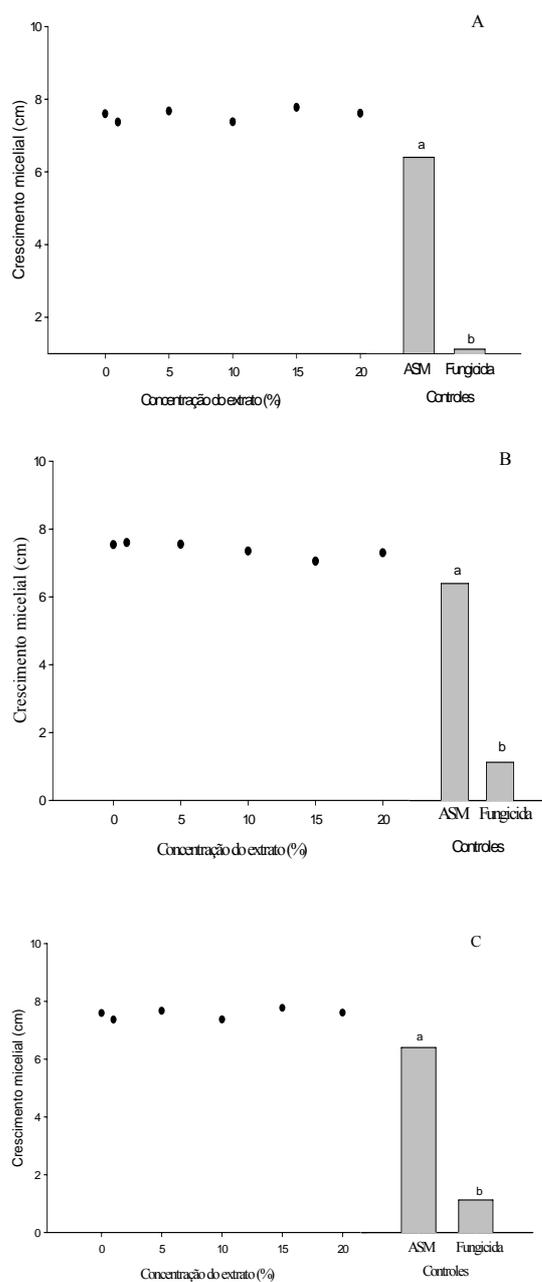


Figura 5 – Crescimento micelial de *C. lindemuthianum* na presença de extratos de micélio (A), filtrado (B) e basidiocarpo (C) de *P. sanguineus*. Controles: acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e azoxystrobin (4 g i.a. L<sup>-1</sup>). Colunas com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

## 4.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

### 4.2.1 Severidade

Assim como no ensaio realizado por Assi (2005), a antracnose apresentou moderada severidade (Tabela 1), determinada pela inoculação realizada com esporos do patógeno e favorecida pela suscetibilidade do cultivar e pela ocorrência de condições ambientais favoráveis à doença.

Na primeira avaliação da doença, na 1ª folha, aos 10 dias após a inoculação (DAI), a testemunha água apresentou redução na severidade quando comparada aos extratos, porém estes não apresentaram diferença estatística, diferindo estes apenas do fungicida e do acibenzolar-S-metil (ASM).

Aos 13 e 16 DAI, os tratamentos com basidiocarpo 5 e 10% apresentaram severidade estatisticamente semelhante à água, sendo que os extratos do filtrado (5 e 10%) reduziram 69 e 67%, respectivamente, a severidade nas 1<sup>as</sup> folhas, e do micélio (5 e 10%) reduziram 56 e 52% respectivamente, e diferiram do controle, água e do fungicida, enquanto o fungicida e ASM reduziram 87 e 76%, respectivamente. No entanto, os extratos do filtrado 5 e 10% e do micélio 5% foram estatisticamente semelhantes ao ASM. Na avaliação aos 19 DAI observou-se que os tratamentos com filtrado (5 e 10%) apresentaram severidade intermediária pois não diferiram dos demais controles. Fato diferente foi observado por Assi (2005), onde extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações 5, 10 e 20% reduziram a severidade de antracnose causada por *C. lindemuthianum* em folhas de feijão que receberam tratamento 3 dias antes da inoculação, sendo que estes extratos não diferiram do tratamento com fungicida (azoxystrobin 0,6 g p. c. L<sup>-1</sup>).

Para a 2ª folha, nas avaliações aos 10 DAI, observou-se que extrato de basidiocarpo a 5% e de micélio 10% não diferiram estatisticamente da testemunha água, já nas demais avaliações (13, 16 e 19 DAI) apenas o basidiocarpo a 5% não diferiu da testemunha água, e os tratamentos com basidiocarpo 10%, filtrado 5 e 10% e

micélio 5 % reduziram a severidade em 63, 63, 62 e 59% respectivamente, e não diferiram estatisticamente do fungicida e do ASM. O tratamento com micélio 10 % nestas avaliações apresentou severidade intermediária.

Os extratos do filtrado e do basidiocarpo apresentaram atividade antimicrobiana, que pode interferir na severidade da doença. Isto pode explicar a severidade dos tratamentos com estes extratos na 1ª folha aos 19 DAI ter diferido estatisticamente da testemunha água, com exceção ao basidiocarpo 5% que não diferiu estatisticamente, porém reduziu a severidade na 1ª folha em 24% em relação à testemunha água.

Tabela 1 – Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro tratado com extrato aquoso de micélio, filtrado e basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus*.

Tratamentos <sup>1</sup>	Severidade da antracnose (%)			
	1ª Folha			
	10 DAI <sup>6</sup>	13 DAI <sup>6</sup>	16 DAI <sup>6</sup>	19 DAI <sup>6</sup>
EA Basidiocarpo 5%	0,86 ab	1,26 ab	1,69 a	1,88 ab
EA Basidiocarpo 10%	0,91 a	1,30 ab	1,53 ab	1,62 bc
EA Filtrado 5 %	0,64 abc	0,74 cd	0,75 cd	0,76 de
EA Filtrado 10%	0,53 bc	0,68 cd	0,74 cd	0,81 de
EA Micélio 5%	0,71 abc	0,91 bcd	1,00 bcd	1,09 cd
EA Micélio 10%	0,64 abc	0,95 bc	1,08 bc	1,17 cd
Água	0,94 a	1,48 a	1,78 a	2,46 a
Fungicida <sup>3</sup>	0,23 d	0,26 e	0,31 e	0,31 f
ASM <sup>4</sup>	0,43 cd	0,55 d	0,57 de	0,60 ef
C.V. (%)	12,71	11,92	12,23	11,56
Tratamentos <sup>1</sup>	Severidade da antracnose (%)			
	2ª Folha			
	10 DAI <sup>6</sup>	13 DAI <sup>6</sup>	16 DAI <sup>6</sup>	19 DAI <sup>6</sup>
EA Basidiocarpo 5%	0,55 ab	0,85 ab	0,99 ab	1,15 ab
EA Basidiocarpo 10%	0,35 bc	0,41 cd	0,52 cd	0,58 cd
EA Filtrado 5 %	0,37 bc	0,44 cd	0,50 cd	0,58 cd
EA Filtrado 10%	0,36 bc	0,48 cd	0,60 cd	0,60 cd
EA Micélio 5%	0,31 bc	0,34 cd	0,44 cd	0,65 cd
EA Micélio 10%	0,48 ab	0,59 bc	0,68 bc	0,80 bc
Água	0,76 a	1,00 a	1,30 a	1,59 a
Fungicida <sup>3</sup>	0,32 bc	0,44 cd	0,52 cd	0,56 cd
ASM <sup>4</sup>	0,19 c	0,28 d	0,35 d	0,39 d
C.V. (%)	17,83	11,04	13,10	13,13

<sup>1</sup> Tratamento realizado por aspersão três dias antes da inoculação;

<sup>2</sup> Tratamento realizado na 1ª folha; inoculação realizada nas 1ª e 2ª folhas;

<sup>3</sup> Azoxystrobyn (4 g i.a. L<sup>-1</sup>);

<sup>4</sup> Acibenzolar-S-metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>);

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

<sup>6</sup> Intervalo de dias após a inoculação (DAI).

Visando comparar os tratamentos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 2).

O tratamento com EA de basidiocarpo 5% não diferiu estatisticamente da testemunha água tanto para a 1ª quanto para a 2ª folha. Tratamentos com filtrado de

cultura (5 e 10%) e micélio 5% inibiram em aproximadamente 57% a severidade da doença, na 1ª folha, o que pode ter ocorrido por indução de resistência local e/ou atividade antimicrobiana direta, uma vez que estes extratos inibiram germinação *in vitro* de conídios de *C. lindemuthianum*.

Para a 2ª folha os extratos de basidiocarpo 10% e de filtrado 5 e 10% reduziram em média 58% a severidade, sendo este valor muito próximo ao obtido com o fungicida, e o extrato de micélio a 5% apresentou em média, redução de 71% da severidade, sendo este estatisticamente semelhante ao ASM, o que indica o potencial indutor de resistência destes extratos, pois de acordo Baldo et al. (2008b) extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus* 5% e ASM inibiram significativamente ( $P < 0,05$ ) o índice de antracnose em hipocótilos de feijoeiro inoculados com *C. lindemuthianum*.

Arruda et al. (2008) observaram que em plantas de soja tratadas com extratos aquosos de *P. sanguineus*, *A. blazei* e *L. edodes* a 20% e inoculadas com *Mycrosphaera diffusa* reduziram a incidência de oídio quando comparadas ao fungicida à base de enxofre, porém nas avaliações de severidade e AACPD observaram que os extratos diferiram da testemunha água, sendo que *L. edodes* apresentou desempenho igual ao fungicida.

Segundo Assi (2005), a utilização de extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* poderia ser uma opção de controle em cultivos orgânicos, uma vez que em sua pesquisa estes apresentaram níveis de controle similares aos obtidos pelo fungicida. Ele salienta que o custo do controle com estes extratos seria inferior ao controle com fungicidas do cultivo convencional, fato este que, associado ao melhor preço do feijão cultivado organicamente, renderia ao produtor um lucro relativamente maior.

Tabela 2 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose causada por *C. lindemuthianum* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos (EA) de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*

Tratamentos <sup>1</sup>	AACPD	
	1ª Folha <sup>2</sup>	2ª Folha <sup>2</sup>
EA Basidiocarpo 5%	12,99 ab <sup>5</sup>	8,14 ab <sup>5</sup>
EA Basidiocarpo 10%	11,26 bc	4,21 cd
EA Filtrado 5 %	6,49 de	4,39 cd
EA Filtrado 10%	6,29 e	4,75 cd
EA Micélio 5%	6,8 de	2,95 d
EA Micélio 10%	8,82 cd	5,74 bc
Água	14,93 a	10,44 a
Fungicida <sup>3</sup>	2,50 f	3,67 cd
ASM <sup>4</sup>	4,9 e	2,79 d
C.V. (%)	7,94	11,01

<sup>1</sup> Tratamento realizado por aspersão três dias antes da inoculação;

<sup>2</sup> Tratamento realizado na 1ª folha; inoculação realizada nas 1ª e 2ª folhas;

<sup>3</sup> Azoxystrobyn (4 g i.a. L<sup>-1</sup>);

<sup>4</sup> Acibenzolar-S-metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>);

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

### 4.3 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

#### 4.3.1 Dosagem de fenilalanina amônia-liase (FAL)

A aplicação de extratos de *P. sanguineus* em plantas de feijão provocou aumentos local e sistêmico na atividade específica de fenilalanina amônia-liase (Figura 6).

Foi observado que aos 3 e 27 DAT (dias após o tratamento) a atividade da FAL na 1ª folha não foi induzida significativamente pelos extratos. Na 2ª folha aos 3 DAT os extratos de basidiocarpo 5 e 10% e de filtrado 5% induziram a atividade da FAL em 72, 72 e 76%, respectivamente, em relação à testemunha água. Aos 27 DAT extrato de basidiocarpo 10% e micélio 10% diferiram estatisticamente da água, induzindo a

atividade da enzima em 58 e 57% respectivamente. Os demais extratos, mesmo não diferindo estatisticamente da testemunha água induziram atividade específica da enzima, indicando o potencial indutor de atividade específica de FAL destes extratos, podendo-se relacionar esta enzima à indução de resistência local e sistêmica com a redução de severidade da antracnose em feijoeiro, indução que fica evidente no somatório da atividade específica da enzima (Figura 7).

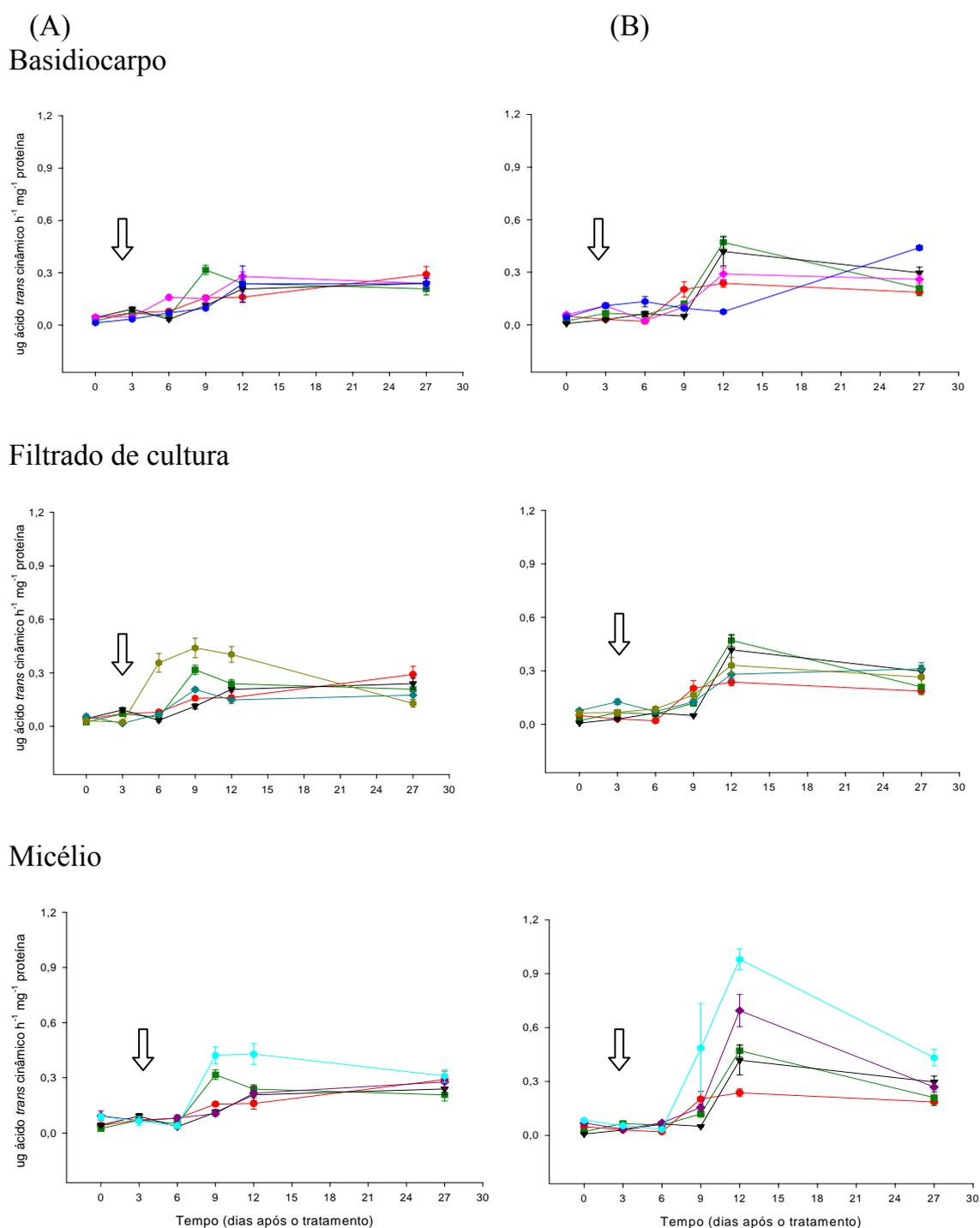


Figura 6. Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (●), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.

Verifica-se que para o somatório da atividade específica de fenilalanina amônia-liase (FAL) na 1ª folha, 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 água tanto para a 1ª quanto para a 2ª folha.

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, isto pode significar que toda a rota dos fenilpropanóides não sofreu alterações, como por exemplo, os mecanismos de síntese de lignina, compostos fenólicos, quinonas entre outros, o mesmo pode ser aplicado aos extratos avaliados no presente trabalho, com exceção aos extratos de micélio e de filtrado 10%, em função desses terem apresentado incremento na atividade da enzima na 1ª folha.

Gális et al. (2004) induziram resistência sistêmica em feijoeiro com ácido salicílico e observaram aumento na expressão da FAL.

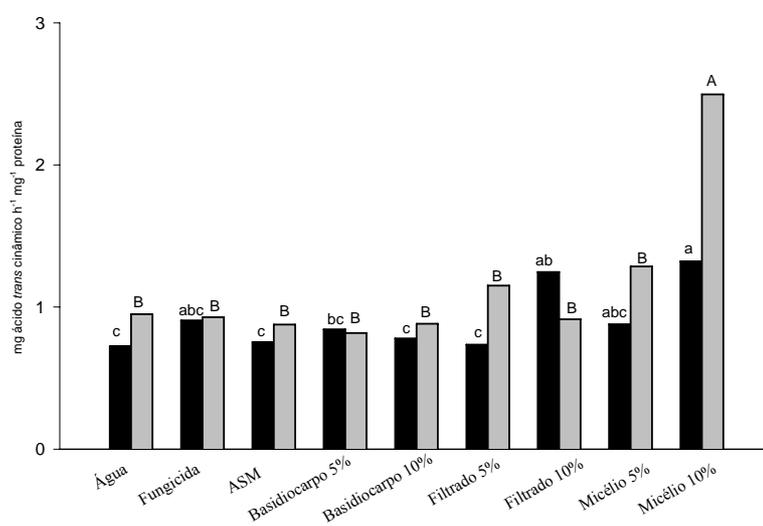
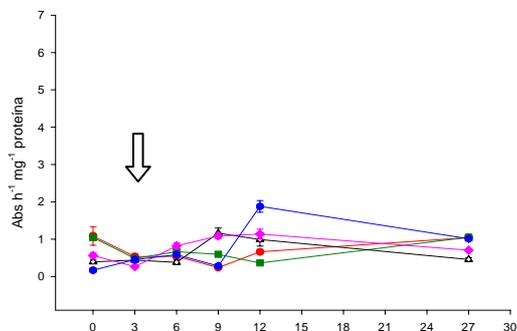


Figura 7. Somatório da atividade de fenilalanina amônia-liase nas 1ª (■) e 2ª (▒) folhas em função do tratamento com: água; fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

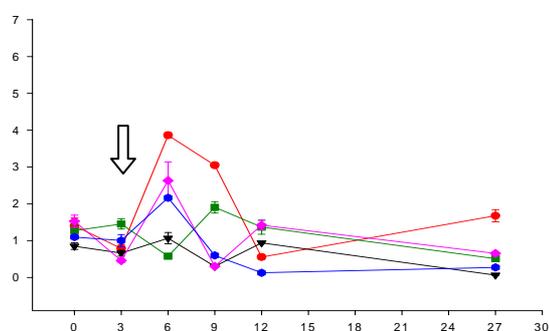
### 4.3.2 Dosagem de $\beta$ -1,3-glucanases

Foram observados incrementos na atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanases em plantas de feijão tratadas com EA de *P. sanguineus* (Figura 8).

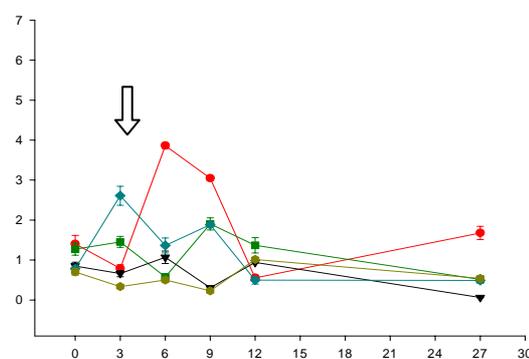
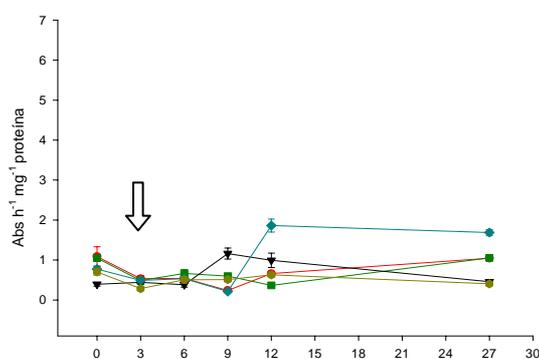
A atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanases na 1ª folha foi induzida pelo EA filtrado 5% aos 27 DAT, diferindo estatisticamente da testemunha água com incremento de 28%, porém com atividade estatisticamente semelhante ao fungicida, enquanto na 2ª folha o EA filtrado 5% aos 3 DAT apresentou incremento de 331% na atividade da enzima em relação à água; EA micélio 10% aos 12 DAT incremento de 1057% e aos 27 DAT foi estatisticamente semelhante à testemunha água.

(A)  
Basidiocarpo

## (B)



## Filtrado de cultura



## Micélio

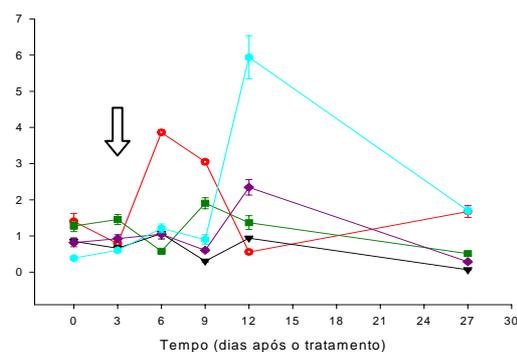
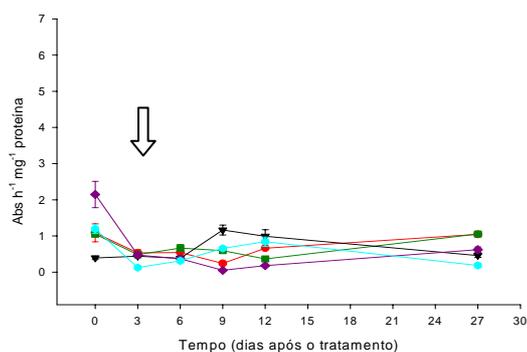


Figura 8. Atividade específica de  $\beta$ -1,3 glucanase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água ( $\bullet$ ), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) ( $\blacksquare$ ), acibenzolar-S-metil (ASM 150 mg L<sup>-1</sup>) ( $\blacktriangledown$ ) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% ( $\blacklozenge$  e  $\bullet$ ), filtrado de cultura a 5 e 10% ( $\blacklozenge$  e  $\bullet$ ) e micélio 5 e 10% ( $\blacklozenge$  e  $\bullet$ ). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.

Na 1ª folha, o somatório da atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase pelo extrato do filtrado 5% apresentou incremento de 26% em relação à testemunha água, sendo este o tratamento que apresentou maior atividade da enzima. Na 2ª folha apenas o ASM e filtrado 10% diferiram estatisticamente da testemunha água, sendo a atividade destes reduzida em 71%. Os demais foram semelhantes à água.

Lurkiv et al. (2008a) verificaram que fração (4º pico protéico) obtida a partir da aplicação de extrato bruto de basidiocarpo de *P. sanguineus* em coluna de cromatografia de filtração em gel, induziu a atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase em cotilédones de soja, sendo que este tratamento induziu a atividade em 260,5%.

Kuhn (2007) verificou que em feijoeiros tratados com *B. cereus* não houve aumento significativo da atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase, enquanto que o indutor abiótico ASM aumentou significativamente a atividade desta enzima. Guarda & Di Piero (2007) observaram aumento da atividade de glucanase em plantas de feijão tratadas com quitosana e inoculadas com *C. lindemuthianum*, em relação às testemunhas.

Stangarlin et al. (2000) verificaram que plantas de feijoeiro quando desafiadas com *Phaeoisariopsis griseola* não alteraram a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, enquanto Stangarlin & Pascholati (2000) observaram indução desta enzima quando desafiadas com *Uromyces appendiculatus*.

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

Os dados obtidos para atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase (Figuras 8 e 9) indicam que esta enzima pode pouco ter contribuído para a redução da severidade da antracnose em feijoeiro.

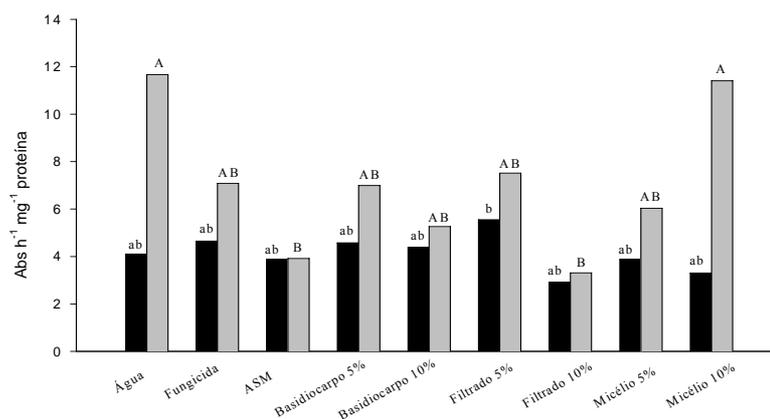
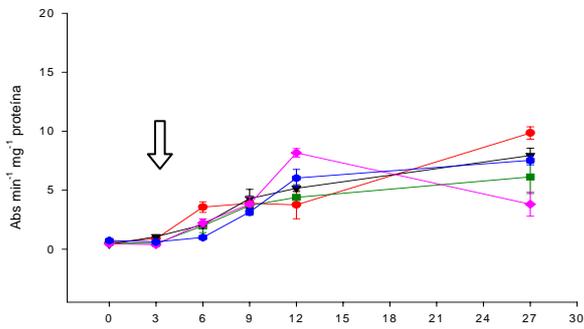


Figura 9. Somatório da atividade específica de  $\beta$ -1,3 glucanase nas 1<sup>as</sup> (■) e 2<sup>as</sup> (▒) folhas em função do tratamento com: água; fungicida (azoxystrobin 4 g i.a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

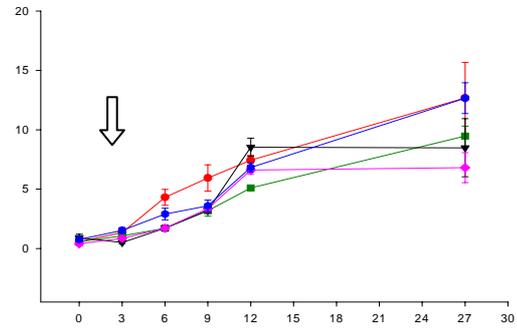
#### 4.3.3 Dosagem de Peroxidasas

As plantas de feijão tratadas com EA de *P. sanguineus* apresentaram incremento na atividade específica da enzima peroxidase (Figura 10).

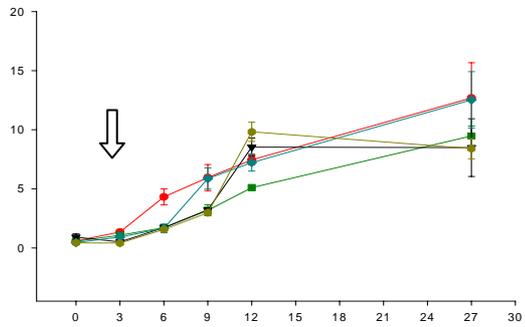
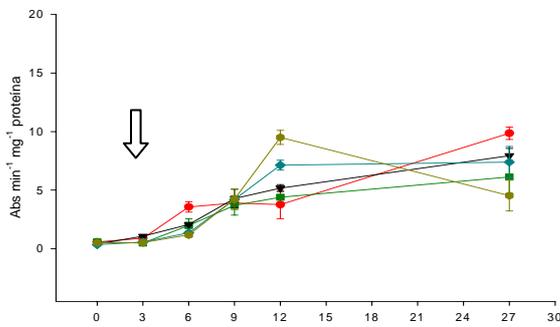
No momento da inoculação do patógeno (3 DAT), a maior atividade específica da peroxidase na 1<sup>a</sup> folha foi observada no tratamento com EA micélio 5%, e mesmo não tendo diferido estatisticamente da testemunha água, apresentou incremento de 81%, porém este extrato reduziu em 14% a atividade da enzima aos 27 DAT. Na 2<sup>a</sup> folha, aos 3 DAT a maior atividade da enzima foi para o tratamento com EA basidiocarpo 10%, que também não diferiu da testemunha água, porém apresentou incremento na atividade da enzima aos 27 DAT. Em virtude dos tratamentos terem apresentado incrementos na atividade específica de peroxidase aos 3 DAT, esta atividade pode estar envolvida no processo de indução de resistência local e sistêmica do feijoeiro à antracnose, pois a severidade, provocada pela doença nos tratamentos com os EA de *P. sanguineus*, exceto basidiocarpo 5%, foi reduzida em relação à testemunha água, apesar destes incrementos não ficarem evidentes no somatório da atividade específica da enzima (Figura 11).

(A)  
Basidiocarpo

## (B)



## Filtrado de cultura



## Micélio

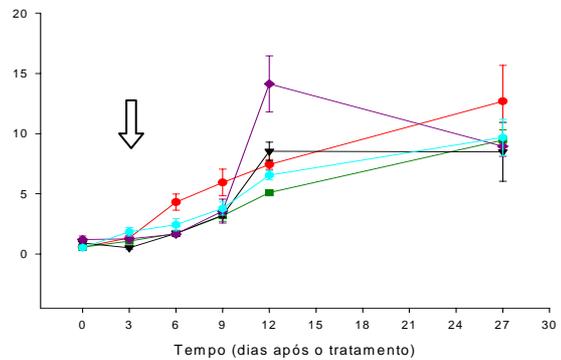
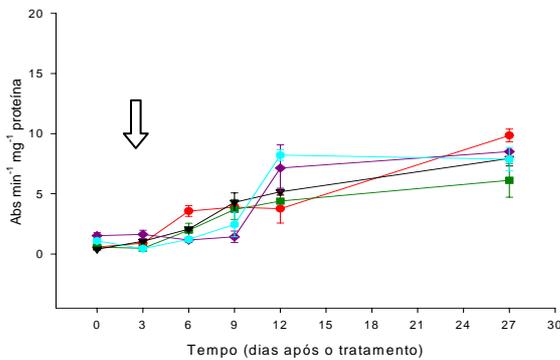


Figura 10. Atividade específica de peroxidase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (●), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◇ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.

O somatório da atividade específica de peroxidases expressos na Figura 11 mostra que não houve indução de atividade destas enzimas em função do tratamento, pois estes não diferiram estatisticamente da testemunha água, porém observa-se que nos tratamentos basidiocarpo 10%, filtrado 5% e micélio 5% houve incremento da atividade específica desta enzima na 2ª folha em 33, 27 e 30% respectivamente, quando comparados aos demais extratos, ASM e fungicida. Assi (2005) observou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* desencadearam uma elevação na atividade específica de peroxidase, comprovando através dos resultados obtidos que pode estar ocorrendo além da peroxidase outros mecanismos de defesa tais como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, entre outros.

Meinerez et al. (2007) verificaram que extrato bruto de basidiocarpo de *P. sanguineus* na concentração 5% promoveu incremento de 41% na atividade de peroxidase em cotilédones de soja e ASM promoveu resultados semelhantes à testemunha água, enquanto Iurkiv et al. (2008b) observaram que aplicação de extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 20% apresentou característica supressora da atividade de peroxidase em cotilédones de soja, proporcionando uma redução de 61,6% na atividade em relação a testemunha água.

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

Guarda & Di Piero (2007) observaram que em feijoeiros tratados com quitosana e inoculados com *C. lindemuthianum* não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a atividade de peroxidases.

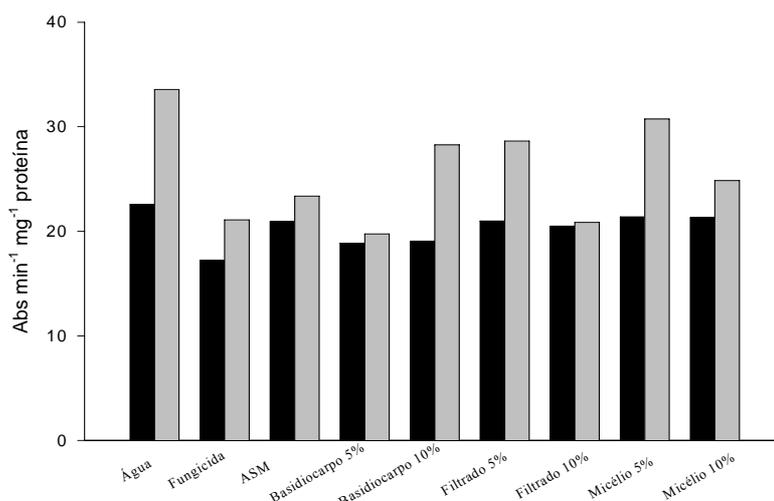
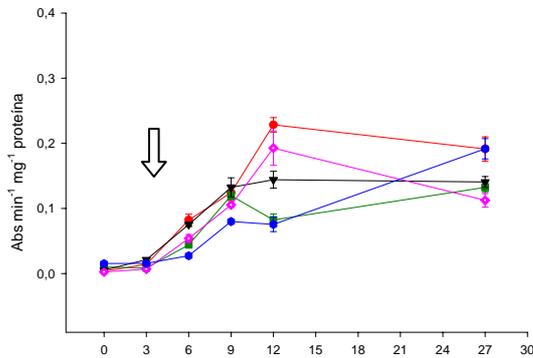


Figura 11. Somatório da atividade de peroxidase nas 1<sup>as</sup> (■) e 2<sup>as</sup> (▒) folhas em função do tratamento com água; fungicida (azoxystrobin 4 g i.a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

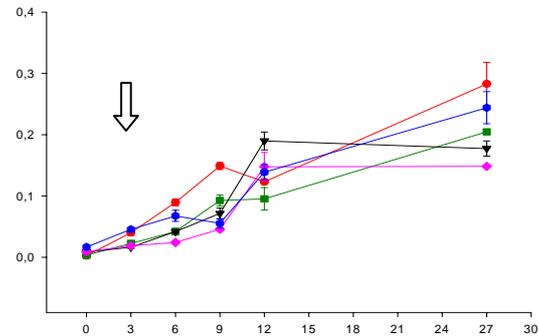
#### 4.3.4 Dosagem de polifenoloxidase

A aplicação de EA de *P. sanguineus* em plantas de feijão não induziu incrementos significativos na atividade específica de polifenoloxidase (Figura 12).

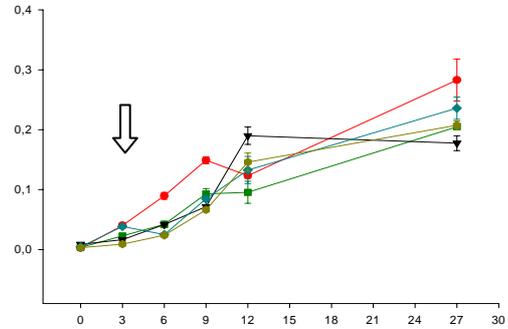
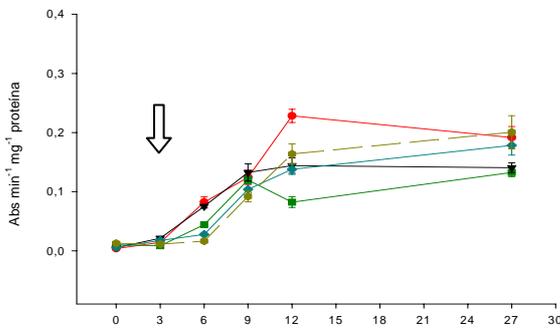
A maior atividade específica de polifenoloxidase no momento da inoculação do patógeno (3 DAT) para a 1<sup>a</sup> folha, foi observada no tratamento com ASM, o que não ocorre na 2<sup>a</sup> folha, onde as plantas tratadas com este indutor apresentaram decréscimo da atividade na maioria dos tratamentos, inclusive da testemunha água.

(A)  
Basidiocarpo

## (B)



## Filtrado de cultura



## Micélio

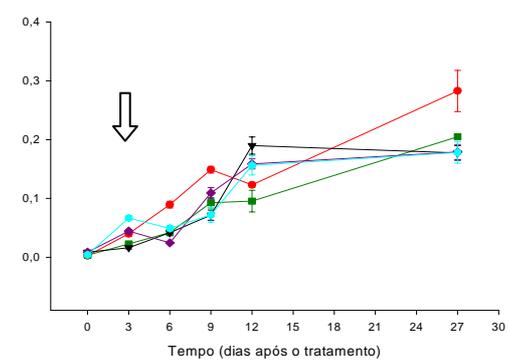
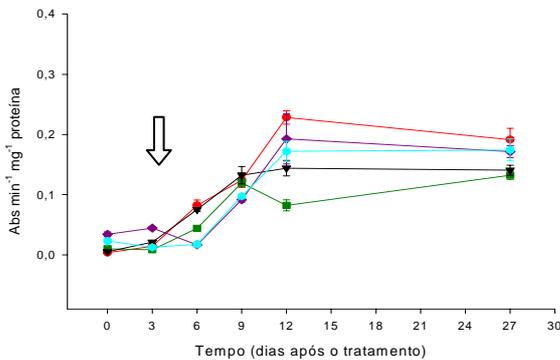


Figura 12. Atividade específica de polifenoloxidase em feijoeiros inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* três dias após os tratamentos com os controles água (●), fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>) (■), acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) (▼) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 5 e 10% (◆ e ●), filtrado de cultura a 5 e 10% (◆ e ●) e micélio 5 e 10% (◆ e ●). (A) e (B) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. A seta indica o momento da inoculação, no 3º dia após o tratamento.

Pelo somatório da atividade específica da polifenoloxidase (Figura 13) verifica-se que os extratos testados não induziram o aumento desta enzima, mas sim uma redução de 37% no tratamento com basidiocarpo a 10% em relação à água para a 1ª folha. O somatório da atividade específica promovido pelo ASM foi semelhante ao obtido por Meinerez et al. (2007), onde os resultados da polifenoloxidase não diferiram estatisticamente da testemunha água, além do decréscimo da atividade com o aumento da concentração do extrato de basidiocarpo também ter sido observado.

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

Em virtude da atividade específica e do somatório da polifenoloxidase (Figuras 12 e 13) terem apresentado maiores atividades para a testemunha água, tanto na 1ª quanto na 2ª folha, a redução da severidade da doença não está relacionada à ativação desta enzima.

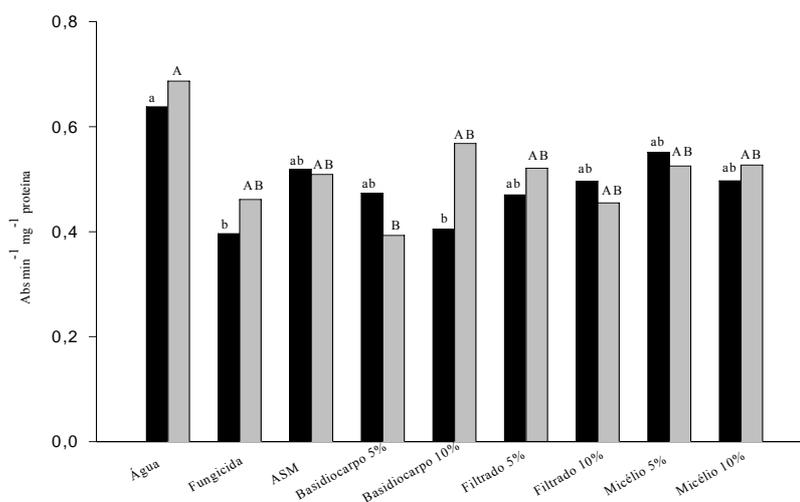


Figura 13. Somatório da atividade de polifenoloxidase nas 1<sup>as</sup> (■) e 2<sup>as</sup> (▒) folhas em função do tratamento com água; fungicida (azoxystrobin 4 g i. a. L<sup>-1</sup>); acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) e extratos de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. As letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

#### 4.4 LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A aplicação de EA de *P. sanguineus* em plantas de feijão induziu a formação de espécies reativas de oxigênio. Na apresentação das figuras para ERO's foi priorizado o foco nas reações.

##### 4.4.1 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Não foi detectada formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas 48 (Figura 14A) e 96 h (Figura 14C) após a inoculação (h a. i.), porém no tratamento com extrato aquoso de basidiocarpo 5%, em 48 h a. i., observou-se região contendo alguns esporos germinados em que há reações ocorrendo na parede das células epidérmicas (Figura 14B).

Em 192 h a. i., na testemunha água, visualizou-se presença de hifa, desorganização citoplasmática, colapso das células da epiderme, representado pela coloração marrom uniformemente distribuída pelo citoplasma, observadas tanto na 1ª quanto na 2ª folha (Figura 14D e 14E, respectivamente); no tratamento com micélio 5% observou-se colapso de células assim como no tratamento com água, para 1ª e 2ª folhas (Figura 14F); as células submetidas ao fungicida e ao ASM apresentaram ausência de reação e de colapso das células; mas, nas tratadas com extrato aquoso de basidiocarpo 5% detectou-se presença de hifa, no entanto não acompanhada de colapso próximo à esta estrutura, sendo as reações observadas à distância desta, provavelmente devido à senescência de algumas partes das folhas.

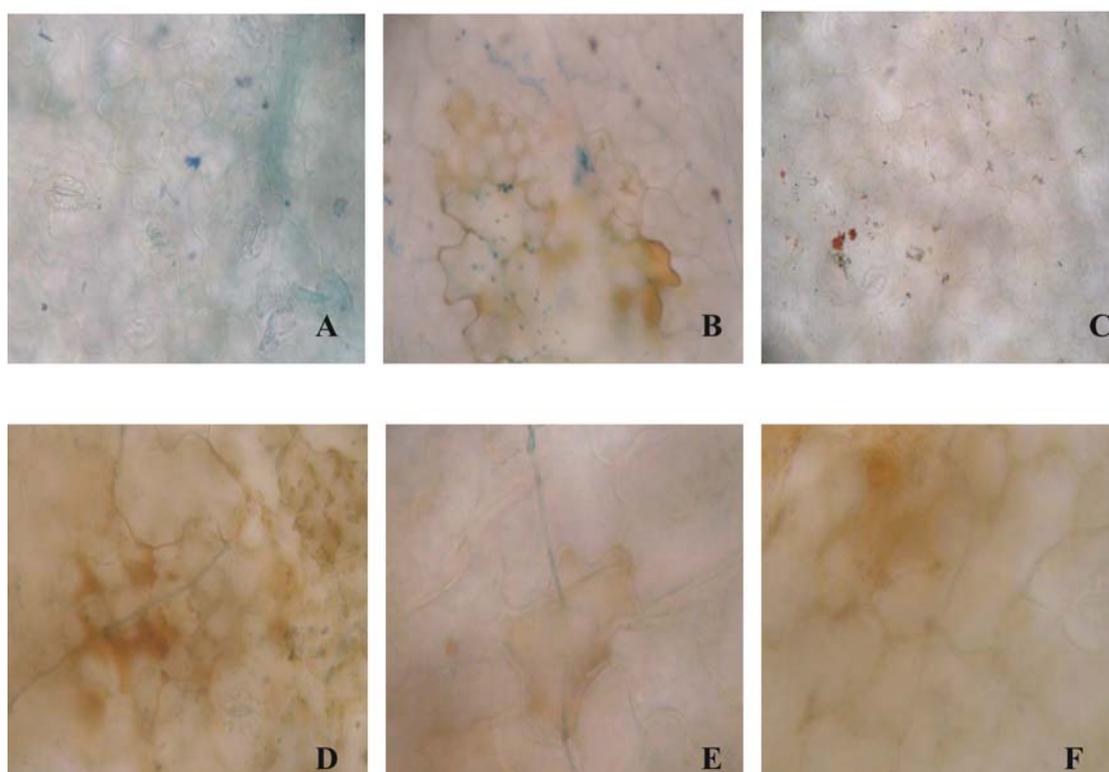


Figura 14. Formação de  $H_2O_2$  em feijoeiro tratado com extratos aquosos de micélio e de basidiocarpo de *P. sanguineus* e inoculados com *C. lindemuthianum*. A: água 46 h. a. i.; B: basidiocarpos 5% 48 h. a. i.; C: água 96 h. a. i.; D: água 192 h. a. i.; E: água 192 h. a. i.; F: micélio 5% 192 h. a. i.

### 5.3.2 Superóxido ( $O_2^-$ )

Nos tempos 48 e 96 h a. i. não houve formação de  $O_2^-$  nos tratamentos água e fungicida. Em 48 h a. i., no tratamento com extrato aquoso de basidiocarpo 5% observou-se fraca reação nas células epidérmicas (Figura 15C); nos tecidos tratados com extrato aquoso de micélio 5% detectou-se presença de reação nas células epidérmicas e do mesófilo (Figura 15A); nos tratados com ASM ocorreu forte reação nas células epidérmicas e do mesófilo (Figura 15B).

No tempo 96 h a. i. observou-se reações fracas nas células epidérmicas e fortes nas células do mesófilo, principalmente nos cloroplastos, no tratamento com ASM (Figura 15D); no tratamento com extrato aquoso de basidiocarpo 5% detectou-se forte reação nas células epidérmicas e presença de necrose (Figura 15E).

Em 192 h a. i. observou-se presença de reação nas células epidérmicas e do mesófilo nos tratamentos água (Figura 15F) e extrato aquoso de basidiocarpo 5% (Figura 15H); e fraca reação nas células da epiderme e do mesófilo foram observadas no tratamento com extrato aquoso de micélio 5%; já no tratamento com fungicida houve fraca reação em parede de células epidérmicas e presença de necrose (Figura 15G).

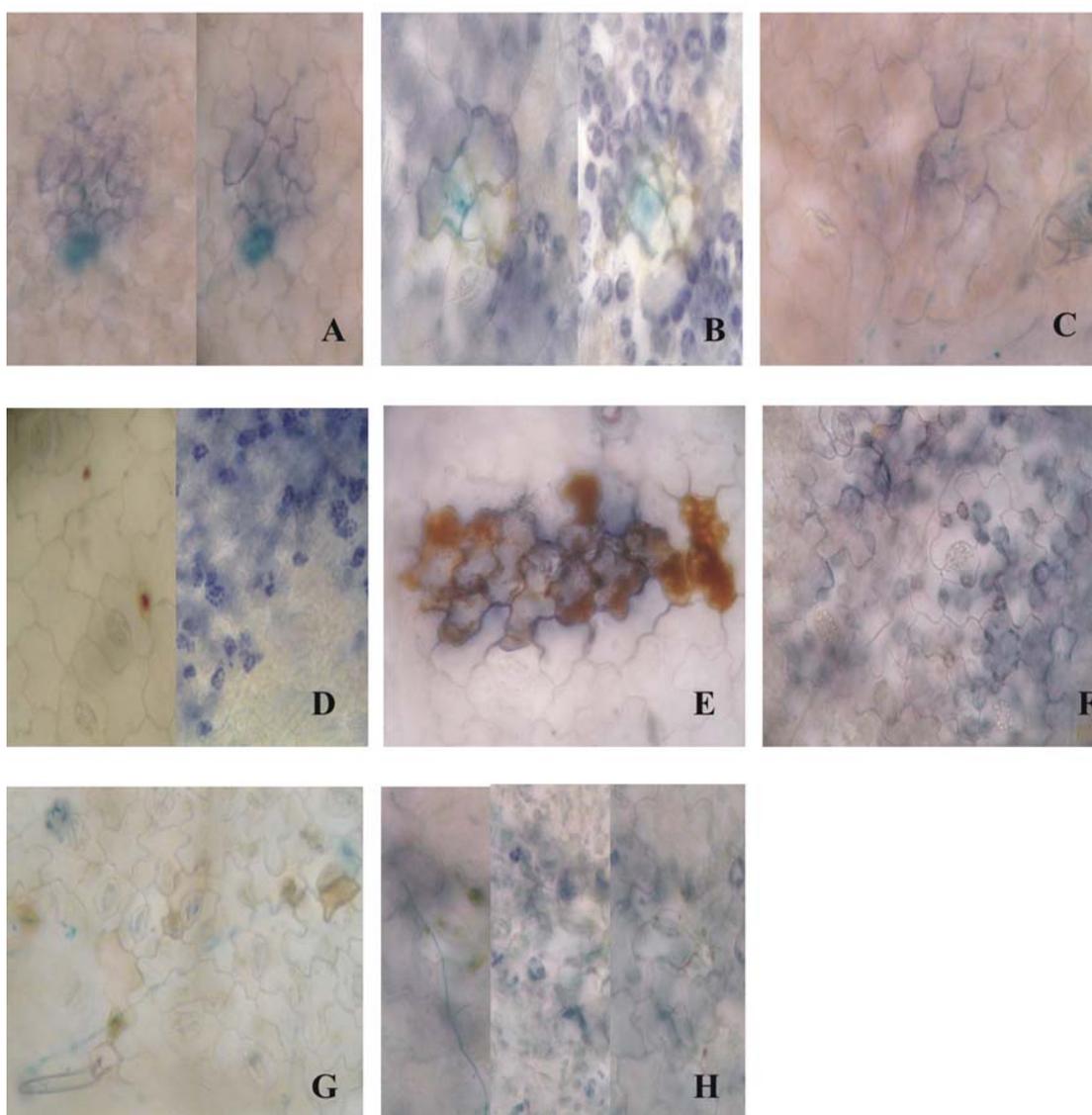


Figura 15. Formação de  $O_2^-$  em feijoeiro tratado com extratos aquosos de micélio e de basidiocarpo de *P. sanguineus* e inoculados com *C. lindemuthianum*. A: micélio 5% 42 h. a. i.; B: ASM 48 h. a. i.; C: basidiocarpo 5% 48 h. a. i.; D: ASM 96 h. a. i.; E: basidiocarpo 5% 96 h. a. i.; F: água 192 h. a. i.; G: fungicida 192 h. a. i.; H: basidiocarpo 5% 192 h. a. i.

Segundo Hammond-Kosack & Jones (2006), culturas de células de feijoeiro, testadas com dois diferentes tipos de elicitores, mostraram um rápido aumento na absorção de oxigênio, seguido pela produção transitória de  $H_2O_2$  e aumento na atividade catalítica da peroxidase. Uma alcalinização transitória do apoplasto, pH 7,0 – 7,2, foi necessária para a geração de  $H_2O_2$  nesse sistema. Nenhuma dessas rotas alternativas foram inibidas por difenilenoidonium, levando a crer que a produção de

ERO's durante as interações incompatíveis poderia ocorrer por mecanismos divergentes em diferentes espécies vegetais e a contribuição de cada mecanismo para a explosão oxidativa poderia variar de acordo com a espécie em questão.

## 5 CONCLUSÕES

Extratos aquosos de *P. sanguineus* controlam a atividade de antracnose do feijoeiro causada por *C. lindemuthianum*, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta, pela inibição da germinação de conídios, quanto por indução de resistência, pela ativação das enzimas peroxidase, fenilalanina amônia-liase e  $\beta$ -1,3-glucanase.

Os extratos aquosos de basidiocarpo e micélio de *P. sanguineus* possuem atividade indutora das espécies reativas de oxigênio peróxido de hidrogênio e superóxido em feijoeiro, contribuindo na proteção da cultura à *C. lindemuthianum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- ALVAREZ, M, E.; PENNELI, R. I.; MEIJER, P. J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92, p. 1-20. 1998.
- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.)**. Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2005. 51 p.
- ARRUDA, R. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; NASCIMENTO, J. F.; OLIVEIRA, D. S. Efeito de *Pycnoporus sanguineus*, *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* no controle de oídio na soja. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 65, 2008.
- BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen and pathogenesis in plants. In: STACEY, G.; KEEN, N. T. (Eds). **Plant Microbe Interactions**, St. Paul, Minnesota. APD Press. 1999. p. 81-119.
- BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvtis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 94, 2008a.
- BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* por derivados de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 94, 2008b.
- BELTRAME, A. B.; KAMIMURA, D. T. T.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Algas eucarióticas e cianobactérias alteram a habilidade de plantas de fumo, inoculadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) em acumular superóxido. Congresso Paulista de Fitopatologia, 29, Botucatu, 2006. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 32(suplemento), p. 67, 2006.

BENINCA, C. P. **Indução de fitolaexinas e atividade em sorgo e soja tratados com extrato de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus***. 2007. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

BERGAMIN FILHO, A. A epidemia como um sistema. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.29, p.574-601.

BETTIOL, W. Controle alternativo de doenças na agricultura orgânica. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 158-160, 2004.

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

BIRECKA, H.; BRIBER, K.A.; CATALFAMO, J.L. Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. **Plant Physiology**, v.52, p.43-49, 1973.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p. 113-138, 1990.

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

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. C. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFV, 1998. p. 375-433.

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

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

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

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

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed). **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. Andover: Intercept, 1996. p. 641-644.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R. RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signalling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

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

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da.; COSTA, J. L. da S.; SOUZA, E. D. de T; BERNI, R. F. Diagnose das doenças. In: CANTERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. p. 18-20.

DANN, E. K.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J. P.; DEVERALL, B. J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 370 -319, 1996.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JR., D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 29-50.

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

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

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

DELLEDONE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactins between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of National Academic Science**, v. 98, p. 13454-13459, 2001.

DUANGMAL, K.; APTEN, 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.

ECKSTEIN, B.; IURKIV, L.; STANGARLIN, J. R.; BALDO, M.; MEINEREZ, C. C.; KUHN, O. J.; MARINI, D.; PAZUCH, D. Indução de resistência pela utilização de produtos abióticos no controle de ferrugem branca em rúcula. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40, Maringá, 2007. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32(suplemento), p. 238, 2007.

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

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

FLURKEY, W. H. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 481-483, 1989.

FREYER, M.; OXBOROUGH, K.; MULLINEAUX, P.M.; BAKER, N.R. Imaging of photo-oxidative stress response in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1249–1254, 2002.

FRITIG, B.; HEITZ, T; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, 10: 16-22, 1998.

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

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

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

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

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

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791. 1996.

HEISER, I.; OSWALD, W.F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: Leite, B.; Pascholati, S.F.; Stangarlin, J.R. (Eds.). **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2004 (no prelo).

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

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 2, n. 5, p. 462-468, 2001.

IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2007. 100p.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BHT) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003.

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

IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; FORMENTINI, H. M.; PAZUCH, D.; KUHN, O. J. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase em rúcula tratada com indutores de resistência bióticos. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40, Maringá, 2007. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32 (suplemento), p. 238, 2007.

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

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

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KUC, J. Systemic Induced reistance. In WALTERS, D. R.; SCHOLE, J. D.; BRYSON, R. J.; PAUL, N. D. e McROBERTS, N. (Ed). **Aspects of Applied Biology 42: Physiological Responses of Plantas to Pathogens**. Dundee: Association of Applied Biologists. 1995 p. 235-242.

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

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review os Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

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

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 123-150, 1991.

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

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.

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

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

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

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

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

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**, Easton, v. 50, p. 2410-2417, 2002.

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

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

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

PAZUCH, D. **Potencial indutor de fitoalexinas do filtrado de cultura e extratos de basidiocarpo e de micélio de *P. sanguineus* em sorgo e soja**. 2007. 37p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

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

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

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio da resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 3426-3436, 2004.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; CORPAS, F.J.; DEL RIO, L.A. Cadmium- induced subcellular accumulation of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in pea leaves. **Plant Cell and Environment**, v.27, p.1122–1134, 2004.

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

ROULIN, S.; BUCHALA, A. J. The induction of  $\beta$ -1,3 glucanases and other enzymes in groundt leaves infected with *Cercospora arachidicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 471-89, 1995.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, S. A.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Ed.) **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1996. p. 669-722.

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (suplemento), p. 54-56, 2003.

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

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

SMÂNIA, A. de F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Síntese de cinabarin por tensões de *Pycnoporus sanguineus* e pela atividade antimicrobiana de encontro as bactérias dos produtos de alimentos. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n.4, p. 317-320, 1998.

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

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. de T. de O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

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

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 16-21, 1994.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. & NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano II, Número 11. 1999. p. 16-22.

STANGARLIN, J. R.; OSSWALD, W. F.; BALBI-PEÑA, M. I.; FRANZENER, G.; BECKER, A. Detection of reactive oxygen species in tomato plants infected with *Alternaria solani*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 38, Gramado, 2005. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30 (suplemento), p. 97, 2005.

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

STICHER, L.; MAUCH –MANI, B.; MÉTRAUX, J-P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p.235-70, 1997.

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

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORN, J. B. (Eds.), **Plant biochemistry**, Academic Press, London, p. 387-416, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 20, p. 105-117, 2004.

TOILLIER, S.; BALDO, M.; MEINEREZ, C. C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; PEITER-BENINCA, C.; STANGARLIN, J. R. Efeito *in vitro* de extratos de *Pycnoporus sanguineus* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40, Maringá, 2007. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32(suplemento), p. 272, 2007.

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

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**, London, v. 55, p. 85-87, 1999.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 60, p. 106-112, 1984.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 72, p. 659-665, 1998.

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

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

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, chitinase, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 359 – 365, 1998.

YOKOYAMA, L. P. Importância econômica. In: **Cultivo do feijoeiro comum**, 2003. Disponível na internet via: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>. Arquivo capturado em 26 de janeiro de 2006.

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

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