

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

**INDUÇÃO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA EM SORGO (*Sorghum
bicolor*) POR FRAÇÕES OBTIDAS DO DECOCTO DE AVENCA
(*Adiantum capillus-veneris*)**

CRISTIANE CLAUDIA MEINERZ

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PARANÁ – BRASIL

2010

CRISTIANE CLAUDIA MEINERZ

**INDUÇÃO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA EM SORGO (*Sorghum
bicolor*) POR FRAÇÕES OBTIDAS DO DECOCTO DE AVENCA
(*Adiantum capillus-veneris*)**

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

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
2010

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, Criador e mantenedor da vida.

Ao Senhor Jesus pelas bênçãos recebidas.

Agradeço a minha família, meus pais amados Rita Carmem Karkow Meinerz e Oldemar Meinerz, pelo amor incondicional proporcionado durante toda minha existência, incentivo, apoio, pelas sábias palavras de conforto em cada fracasso, pela compreensão e por todos os esforços não medidos para que eu pudesse chegar ao final desta jornada.

À minha irmã Josie Danielle Meinerz, pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Professor Dr. José Renato Stangarlin, pela oportunidade, orientação, atenção, compreensão, ensinamento, paciência e pelas sábias palavras em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos Sidnei Francisco Müller, Deise Dalazen Castagnara, Heloísa Maria Formentini, Luciana Iurkiv, Gilmar Franzener, Gabriela de Moura, Omari Dildey, Tatiane Martinazzo-Portz, Viviane Ruppenthal, Juliane Mendes Lemos, Tiago Zoz, Fabio Steiner, Michele Alessandra Hartmann Schmidt, as quais estiveram constantemente presentes e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

Aos professores Dr. Odair José Kuhn e Dr. Roberto L. Portz pela ajuda, ensinamentos e disponibilidade no desenvolvimento de diversas metodologias.

Às amigas Luciana Cleci de Oliveira, Márcia Vargas Toledo, Mauricele Baldo, Josiane Mangoni, Luciana Iurkiv, Francielle Fiorentin, Marta Bianchini, pela amizade e companheirismo, estando sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos, tristes ou felizes.

Aos colegas de pós-graduação, principalmente a Sidnei Francisco Muller, Deise Dalazen Castagnara, Daniela Mondardo, Patrícia Paula Bellon, pelos trabalhos realizados em conjunto e onde estiveram presentes no desenvolvimento deste trabalho e me apoiaram para a realização do mesmo.

Aos Professores Dr. Vandeir Francisco Guimarães, Dr^a Márcia de Moraes Echer, Dr^a Andreia Cristina Peres Rodrigues da Costa.

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

À EMBRAPA Milho e Sorgo pelo envio de sementes de sorgo para o desenvolvimento de experimentos.

À Dr^a Kátia R. F. Schwan-Estrada pelo empréstimo de reagentes para a condução das análises bioquímicas.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos meus amigos (as) que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desta obra, minha gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	18
2.1.1 Controle alternativo de doenças.....	19
2.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	20
2.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS	22
2.4. FITOALEXINAS.....	24
2.5. PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA.....	27
2.5.1. Peroxidases (EC 1.11.1.7)	27
2.5.2. Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)	28
2.5.3. Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).....	29
2.5.4. Quitinases (EC 3.2.1.14)	30
2.5.5 Proteínas.....	30
2.6 POTENCIAL DE PLANTAS MEDICINAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS	31
2.6.1 Avenca (<i>Adiantum capillus-veneris</i>)	33
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4 CAPÍTULO I – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO TRATADOS COM FRAÇÕES DE <i>Adiantum capillus-veneris</i> OBTIDAS POR SATURAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT	45
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	50

4.2.1 Obtenção do decocto de <i>A. capillus-veneris</i>	50
4.2.2 Precipitação fracionada do decocto de avenca com sulfato de amônio	50
4.2.3 Cromatografia de filtração em gel (CFG).....	51
4.2.4 Bioensaio para produção de fitoalexinas em mesocótilo de sorgo.....	51
4.2.5 Análise dos resultados	52
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.3.1 Purificação parcial por CFG	53
4.3.2 Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo	57
4.4 CONCLUSÃO.....	64
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
5 CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM SORGO POR FRAÇÕES OBTIDAS DA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOLOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL A PARTIR DE <i>Adiantum capillus-veneris</i>	69
RESUMO.....	69
ABSTRACT	71
5.1 INTRODUÇÃO	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
5.2.1 Obtenção do decocto de <i>A. capillus-veneris</i>	75
5.2.2 Precipitação fracionada do decocto de avenca com sulfato de amônio	75
5.2.3 Cromatografia de filtração em gel (CFG).....	76
5.2.4 Determinação de enzimas relacionadas à defesa.....	76
5.2.4.1 Obtenção da preparação enzimática.....	77
5.2.4.2 Atividade de peroxidases	77
5.2.4.3 Atividade de polifenoloxidase	77
5.2.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase	78
5.2.4.5 Atividade de quitinases.....	78
5.2.4.6 Determinação de proteínas totais.....	79
4.2.5 Análise dos resultados	79
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.3.1.1 Atividade de peroxidase	80

5.3.1.2 Atividade de polifenoloxidasas	82
5.3.1.3 Atividade de fenilalanina amônia - liase	83
5.3.1.4 Atividade de quitinases.....	84
5.3.2 Indução de enzimas relacionadas à defesa por frações obtidas por cromatografia de filtração em gel a partir de <i>A. capillus-veneris</i>	85
5.3.2.1 Atividade de peroxidases	85
5.3.2.2 Atividade de polifenoloxidasas	88
5.3.2.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase	90
5.3.2.4 Atividade de quitinase	92
5.4 CONCLUSÃO.....	95
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1 Planta medicinal avenca (*Adiantum capillus-veneris*). 34
- FIGURA 4.1 Frações protéicas (-●-: absorbância a 280 nm) e glicídicas (-○-: absorbância a 410 nm) de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) a 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel. ...55
- FIGURA 4.2 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel, na atividade de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula para comparação com ASM e minúsculas para comparação com tampão não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). 62
- FIGURA 5.1. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo. 82
- FIGURA 5.2. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo.. ... 83
- FIGURA 5.3. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo. 84
- FIGURA 5.4. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de quitinases em folíolos de sorgo... 85
- FIGURA 5.5. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônia em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo.87
- FIGURA 5.6. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônia em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo.89
- FIGURA 5.7. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônia em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100%

(F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo.91

FIGURA 5.8. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônia em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de quitinase em folíolos de sorgo.93

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 Massa molecular e concentração de açúcares redutores de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel do decocto de *Adiantum capillus-veneris* e de seus respectivos cortes com sulfato de amônio (AS). 56

TABELA 4. 2 Concentração protéica e de açúcares redutores em frações do decocto de *Adiantum capillus-veneris*, obtidas porprecipitação com sulfato de amônio e seu efeito na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. 61

RESUMO

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A aplicação de extratos vegetais visando à indução de mecanismos de resistência é uma alternativa interessante ao controle químico, entretanto, nestes extratos pode ocorrer além da presença de indutores, a presença de supressores. Este trabalho teve por objetivo a purificação parcial, por meio de cromatografia de filtração em gel (CFG) e precipitação com sulfato de amônio (SA), de compostos presentes em decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*), eficientes na indução de mecanismos de defesa em mesocótilos de sorgo, incluindo as fitoalexina deoxiantocianidinas e as proteínas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e quitinase, buscando selecionar frações potencialmente eficientes na indução de resistência em plantas. Decocto (EA 1%) de *A. capillus-veneris* foi fracionado com concentrações de sulfato de amônio de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% e esses “cortes” foram submetidos à cromatografia de filtração em gel (CFG). Foram obtidos nove picos protéicos e um pico glicídico para EA 1% com massas moleculares variando de 0,61 à 0,01 KDa; no corte 0-20% foram obtidos dois picos protéicos e dois glicídicos, com massas moleculares menores que 0,01 KDa, e concentração de açúcares redutores variando de 4,1 a 17,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; no corte 20-40% três picos protéicos (111,5 à 0,98 KDa) e cinco glicídicos (11,3 a 73,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de açúcares); no corte 40-60% dois picos protéicos (111,5 à 0,09 KDa) e dois glicídicos (5,6 a 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$); no corte 60-80% seis picos protéicos (menor que 0,02 KDa) e dois glicídicos (16,5 a 51,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$); e no corte 80-100% três picos protéicos (menor que 0,09 KDa). Mesocótilos de sorgo foram tratados com as frações provenientes da CFG, além do decocto a 1%, acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg. L⁻¹ do i.a. como elicitor de referência) e tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0, totalizando 42 tratamentos. Após incubação por um período de 96 h, avaliou-se dos teores de fitoalexinas nos mesocótilos e análises bioquímicas dos folíolos. O tratamento pico II (0,09 KDa) do EA 1% mostrou-se eficiente na indução de fitoalexinas, sendo superior em 6,68% ao ASM. Entre os cortes, 60-80% permitiu incremento de 76% em relação ao ASM. Para peroxidase o pico IV (menor que 0,01 KDa) do EA 1% incrementou 21% a

atividade em relação a testemunha água e 44% ao ASM. Para os precipitados 0-20% o pico protéico II (menor que 0,01 KDa) promoveu incremento de 39% na atividade em relação ao corte 0-20% e 19% para o EA 1%. O precipitado 80-100% foi superior 89% ao ASM. Para polifenoloxidase o pico protéico VI (menor que 0,01 KDa) do EA1% reduziu 88% a atividade em relação ao ASM. Para fenilalanina amônia-liase o pico protéico II (menor que 0,01 KDa) do corte 0-20% foi 91% superior ao EA 1%. Para quitinase o pico protéico IV (menor que 0,01 KDa) do EA 1% foi 68% superior ao ASM. Foi possível induzir mecanismos de defesa em sorgo pela aplicação de frações parcialmente purificadas de *A. capillus-veneris*, o que pode permitir a obtenção de novas moléculas e o desenvolvimento de métodos alternativos para controle de doenças em plantas.

Palavras chaves: indução de resistência, cromatografia de filtração em gel, proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas, deoxiantocianidinas.

INDUCTION OF BIOCHEMICAL DEFENSE MECHANISMS IN (*Sorghum bicolor*) BY FRACTIONS FROM DECOCT OF MAIND HAIR (*Adiantum capillus-veneris*)

ABSTRACT

Induction of resistance involves the activation of plant defense mechanisms in response to treatment with biotic or abiotic elicitors. The application of plant extracts in order to induce resistance mechanisms is an interesting alternative to chemical control, however, besides the presence of inducers, can occur the presence of suppressors. This study aimed to partially purificate through gel filtration chromatography (GFC) and precipitation with ammonium sulfate (SA), compounds present in decoct of *Adiantum capillus-veneris*, capable to induce defense mechanisms in sorghum mesocotyls, including phytoalexins and peroxidase, polyphenoloxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chitinase. The decoct 1% was fractionated with concentrations of ammonium sulfate, 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100% of SA and those fractions were subjected to GFC. We obtained nine protein peaks and one glucosic peak for decoct with molecular weights ranging from 0.61 to 0.01 KDa; to fraction 0-20% were obtained two protein and two glucosic peaks, with molecular weights lower than 0.01 KDa, and concentration of sugars ranging from 4.1 to 17.5 mg mL⁻¹; to fraction 20-40% were obtained three protein peaks (0.98 to 111.5 KDa) and five glucosic peaks (11.3 to 73.7 mg mL⁻¹); to fraction 40-60% were obtained two protein peaks (0.09 to 111.5 KDa) and two glucosic peaks (5.6 to 7.5 mg mL⁻¹); to fraction 60-80% were obtained six protein peaks (lower than 0.02 KDa) and two glucosic peaks (16.5 to 51.3 mg mL⁻¹); and to fraction 80-100% were obtained three protein peaks (lower than 0.09 KDa). Sorghum mesocotyl were treated with fractions from the GFC, and decoct, acibenzolar-S-methyl (ASM) (125 mg L⁻¹ of a. i. as elicitor of reference) and sodium phosphate buffer 10 mM pH 6.0. After incubation of 96 h were measured the levels of phytoalexins in mesocotyls and the activity of defense-related enzymes in leaves. Treatment with peak II (0,09 KDa) induced phytoalexin 6.68% more than. Among the fractionn, 60-80% increased 76% compared to ASM. To peroxidase the peak IV (lower than 0,01 KDa) increased 21% the activity compared to control water, and 44% compared to ASM. For the fraction 0-20%

the protein peak II (lower than 0,01 KDa) increased 39% the activity in relation to the fraction 0-20% and 19% in relation to decoct. The fraction, 80-100% increased 89% compared to, ASM. For the PPO the peak VI (lower than 0,01 KDa) from decoct decreased 88% the activity compared to ASM. For PAL the peak II (lower than 0,01 KDa) from fraction 0-20% was 91% higher than decoct. For chitinase 1% peak IV (lower than 0,01 KDa) from decoct was 68% higher than the ASM. It was possible to induce defense mechanisms in sorghum by the application of partially purified fractions from *A. capillus-veneris*, which can allow to obtain new molecules and development alternative methods to control plant diseases.

Key words: induction of resistance, gel filtration chromatography, pathogenesis related proteins, phytoalexins, deoxyanthocyanidins.

1. INTRODUÇÃO

A atividade agrícola é governada por aspectos de ordem técnica, econômica, política e social. Do ponto de vista técnico, o objetivo maior é o aumento na produtividade, o que somente pode ser alcançado mediante o manejo adequado dos fatores de produção: clima, variedade, adubação, tratos culturais e fitossanitários.

A agricultura atual tem aumentado em muito a potencialidade de produção, para atender a demanda por alimentos, onde a prática da agricultura econômica necessita de uma série de diferentes setores, tais como mecanização, melhoramento de cultivares e do uso excessivo de moléculas químicas mais eficientes para o controle de pragas e doenças de plantas. O uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente e tem favorecido a seleção de raças insensíveis de patógenos a estas substâncias químicas (GHINI; KIMATI, 2000). Isso se traduz pelo acúmulo de resíduos tóxicos ao longo da cadeia trófica, com impactos em longo prazo e danos a flora e a fauna, bem como às atividades produtivas diretamente dependentes de uso de recursos naturais, à vida selvagem, à piscicultura, aos insetos benéficos e mesmo ao homem (BOREM, 2001). Nesse contexto, a busca por alimentos mais saudáveis, isentos de resíduos tóxicos, vem sendo enfatizada, e com isso, estimula a pesquisa por novas medidas de proteção das plantas contra fitopatógenos.

Além disso, o alto custo, o aumento da resistência dos fitopatógenos a esses produtos químicos (GHINI; KIMATI, 2000) e a conscientização do consumidor na procura de alimentos sem resíduos de pesticidas, têm levado à necessidade de se obter alternativas ao controle de doenças em plantas (NAKASONE et al., 1999).

Visando a redução da utilização de produtos químicos no controle de fitopatógenos, tem-se buscado desenvolver alternativas eficientes, as quais evitem produzir os danos associados ao controle químico convencional. A indução de resistência surge como alternativa a este método convencional, buscando o controle de doenças pela aplicação de agentes bióticos e abióticos, capazes de ativar os mecanismos naturais de defesa das plantas, sem qualquer alteração em seu genoma (IURKIV, 2008).

Um dos enfoques da agricultura de base agroecológica é o controle alternativo de doenças de plantas, no qual se inclui a indução de resistência. A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa presentes, sendo de forma latente na planta ou existentes em baixa quantidade (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997). Esta ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos (como microrganismos viáveis ou inativados) (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994) ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido salicílico (RASKIN, 1992), ácido jasmônico e acibenzolar-S-metil (SOBRINHO et al., 2005). Essas moléculas capazes de ativar/induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamadas de eliciadores (SMITH, 1996), podendo, neste caso, atuarem como indutores de resistência. A forma de ação desses indutores é muito ampla e muitas vezes desconhecida, mas sabe-se que atuam na síntese de ácido salicílico, ativação de enzimas relacionadas à patogênese e na indução à produção de metabólitos secundários (BONALDO et al., 2005), como as fitoalexinas.

As fitoalexinas apresentam natureza química variada, são antibióticos com baixa especificidade e seu modo de ação inclui diversos efeitos citológicos que culminam na inibição do crescimento ou morte do patógeno (BRAGA, 2008).

Atualmente, um enorme volume de pesquisas dentro da fitopatologia se concentra no fenômeno da especificidade entre o patógeno e o hospedeiro – fenômeno de reconhecimento, do papel das fitotoxinas e enzimas microbianas extracelulares na patogênese e dos fatores bioquímicos de resistência, como compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (PASCHOLATI, 1993).

Assim, a resistência induzida em plantas representa uma forma alternativa de controlar doenças de plantas e tem sido efetiva tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas.

As plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003) como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta) (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Trabalhos desenvolvidos com o extrato bruto e óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos pela indução de fitoalexinas, denotando a presença de

composto com características de eliciadores, com potencial de controle de doenças em plantas por indução de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997; STANGARLIN et al., 1999; MOTOYAMA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

A capacidade do extrato aquoso de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) em causar acúmulo de fitoalexinas em sorgo foi demonstrada por Meinerz et al. (2008), porém, não é conhecida a natureza dessas moléculas eliciadoras. A purificação parcial de eliciadores a partir de extratos brutos visa concentrar o princípio ativo e se constitui numa ferramenta de grande importância no estudo e caracterização de moléculas com potencial indutor de resistência.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo purificar parcialmente, através de precipitação fracionada com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel, compostos elicitores de fitoalexinas e de proteínas de defesa vegetal em sorgo, a partir de decocto de avenca (*A. capillus-veneris*), capazes de selecionar frações potencialmente eficientes para trabalhos futuros na indução de resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

O contínuo crescimento da população humana tem trazido como consequência imediata e inevitável um aumento proporcional na necessidade de alimentos. 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)

Uma das grandes preocupações atuais é conseguir manter a produção de alimentos em níveis sustentáveis, uma vez que na agricultura, as perdas provocadas por insetos, nematóides, doenças e plantas daninhas chegam a 30-40 % do total global, com proporções substanciais mais altas em países em desenvolvimento (THOMAS, 1999).

Para o controle de doenças tem sido empregado basicamente o uso de fungicidas em função de ser método prático, eficiente, economicamente viável para garantir alta produtividade e qualidade de produção, alcançando bons resultados em curto prazo. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos tornaram as práticas do uso de variedades resistentes e controle químico amplamente difundidas para diversas culturas vegetais. Embora esses métodos diminuam o problema das doenças, novas raças de patógenos podem surgir e causar a quebra de resistência nos primeiros anos de lançamento de uma cultivar. Por outro lado, o uso de fungicidas é considerado um “input” de alta tecnologia, que nem sempre é adequado aos pequenos produtores (RAVEN et al., 2001). No entanto, o uso indiscriminado de tais produtos pode acarretar, em longo prazo, o surgimento de populações de patógenos insensíveis a estes produtos, além de deixar resíduos químicos que podem ser prejudiciais ao homem, animais e ambiente (GHINI; KIMATI, 2000).

Aproximadamente meio milhão de toneladas de pesticidas e herbicidas é produzido anualmente para aplicação em culturas, apenas nos Estados Unidos. Desse

enorme total, estimou-se que apenas 1% de fato alcança o organismo alvo (RAVEN et al., 2001). Mas, a agricultura agroecológica vem buscando métodos menos danosos para melhorar os rendimentos agrícolas e visa à 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 (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Neste contexto, a própria natureza vem sendo investigada como fonte de soluções em potencial (SAITO; LUCHINI, 1998).

2.1.1 Controle alternativo de doenças

Ao longo dos anos a agricultura tem buscado máxima potencialidade de produção com a aplicação de pesticidas para o controle de pragas e doenças em plantas. 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).

Nesse contexto, termos como “agricultura alternativa” ou “agricultura sustentável” obtêm expressão política (ZADOKS, 1992) e estimulam a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças.

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças de plantas, no qual se incluem o controle biológico e o controle induzido, também conhecido como indução de resistência, resistência induzida e imunização em plantas (não incluídos nesse conceito o controle químico clássico e o melhoramento genético) (BETTIOL, 1991), e do uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência, como óleos essenciais e extratos de plantas medicinais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

O controle biológico visa manter um equilíbrio no agroecossistema e 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; MORAES, 1992). Já a indução de resistência envolve o aspecto fisiológico, com a capacidade de ativação de mecanismos latentes de defesa das plantas contra fitopatógenos através da ação de moléculas indutoras ou elicitoras em resposta aos tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (CAVALCANTI et al., 2005 a; BONALDO et al., 2005).

Uma diferença fundamental entre o controle biológico e o controle induzido é que, no primeiro, a ação controlada se faz direta e primariamente sobre o patógeno, enquanto que, no segundo, a ação se dá sobre a planta hospedeira, modificando a sua relação com o patógeno (MORAES, 1992).

2.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A indução de resistência em plantas a patógenos é conhecida há mais de 50 anos, mas somente muito tempo depois o fenômeno começou a ser investigado de forma mais direcionada para uma aplicação prática, visando aumentar a produtividade de culturas pelo controle de enfermidades de plantas (ROMEIRO, 2008). Nos últimos anos, pesquisadores têm se dedicado ao estudo do controle alternativo de doenças em plantas, o qual usa, desde microrganismos antagônicos, até espécies de plantas medicinais, que apresentam à partir do seu metabolismo secundário, a produção de moléculas químicas que atuam de forma tóxica a uma diversidade de microrganismos, inclusive fitopatogênicos (KUHN, 2003).

A expressão indução de resistência pode ser utilizada para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde foi feito o tratamento com o agente indutor, como pode também indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta em outro local diferente daquele onde foi aplicado o indutor e sem qualquer alteração do genoma da planta (MORAES, 1992). Isso ocorre através da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa tais como:

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

Estes agentes indutores de origem biótica (enzimas microbianas, microrganismos viáveis ou inativados e material de parede de fungo e células vegetais) ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6 dicloroisonicotínico (HIJWEGWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (RESENDE et al., 2001), além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005 a), capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamados de eliciadores (SMITH, 1996), podendo apresentar natureza química variada, tais como oligossacarídeo, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999). O produto acibenzolar-S-metil, têm sido utilizado nos últimos anos como indutor químico de resistência, contra fungos, vírus e bactérias. O ASM promove nas células das plantas a indução para produção de proteínas relacionadas com a patogênese, tais como β -1,3-glucanase e quitinase, que são capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicos (KOBAYASTI et al., 2001; MCKENZIE, 2001; SILVA et al., 2001; OSSWALD et al., 2004).

A proteção conferida pelo tratamento é capaz de proteger a planta contra infecções subseqüentes por diferentes patógenos (KUC, 1995). A proteção das plantas contra fitopatógenos, através da resistência induzida, exhibe vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural de proteção; transmissão por enxertia; e presença do potencial genético para resistência nas plantas suscetíveis (PASCHOLATI, 2003). A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente 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.

Dentre esses mecanismos de resistência pode-se mencionar aumento na atividade da enzima oxidativa peroxidase, acúmulo de fitoalexinas, quitinases, β – 1,3-glucanases, outras proteínas relacionadas à patogênese em geral e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, bem como a lignificação de tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Indutores de resistência alternativos têm sido utilizados nos últimos anos, como os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Portanto, reconhece-se, o grande potencial de tais compostos como uma nova geração de produtos para controle de doenças, reduzindo o uso de fungicidas e oportunizando o uso de agentes de biocontrole (LYON; NEWTON, 1997).

2.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS

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

Segundo Agrios (2005), a resistência de um hospedeiro a uma doença pode ser definida sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos.

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

produzem substâncias que mostram-se tóxicas ao patógeno e criam condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

São exemplos de cada grupo:

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

Através de mecanismos induzidos de defesa ou após o reconhecimento de um patógeno, ocorre a produção de um sinal, liberado a partir da folha infectada, sendo translocado intracelularmente para outras partes da planta. Esse sinal desencadeia mudanças em fluxos iônicos ao longo da membrana plasmática, eventos de fosforilação de várias proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio (como peróxido de hidrogênio e radical superóxido) e por fim induz reações de defesa, resultando na resistência induzida. Essa resistência é relatada em diversas espécies, apresentando defesa contra vários microrganismos, necessitando de um tempo após o tratamento indutor para que o mesmo se estabeleça e para que seja mantido por um longo período (MÉTRAUX, 2001).

Uma barreira química importante realizada pela planta é a reação de hipersensibilidade, que consiste em um dos mais eficientes mecanismos de defesa da planta a patógeno, onde há a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta (STINTIZI et al., 1993). Essa reação pode ser vista como uma espécie de “suicídio” de algumas poucas células da planta em prol da sobrevivência das demais e é considerada como uma forma de defesa induzida, culminando na parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta. A resposta ocorre em função do reconhecimento da infecção, por parte do hospedeiro, como uma consequência da incompatibilidade entre planta e patógeno, portanto a reação de hipersensibilidade só ocorre quando a planta é infectada por vírus, fungos ou bactérias (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

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 primários e secundários, bem como enzimas relacionadas diretamente na atividade de defesa, como as β -1,3-glucanases (CAVALCANTI et al., 2005 b).

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).

2.4. FITOALEXINAS

Um dos aspectos mais interessantes das relações planta-patógeno é a capacidade que muitas espécies vegetais possuem de responder à infecção microbiana através da síntese localizada de substâncias de defesa, denominadas fitoalexinas. Estas substâncias, ausentes ou em baixas concentrações nos tecidos da planta sadia, passam a ser sintetizadas e acumuladas no local da infecção e nos seus arredores, após o contato com microrganismos ou com produtos deles derivados, conhecidos como eliciadores ou elicitores (BRAGA, 2008).

As fitoalexinas (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) são definidas como compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, que são sintetizados pelas plantas e que se acumulam nas células vegetais temporariamente após estresses físicos, químicos ou biológicos, em resposta à infecção microbiana (BRAGA, 2008). Talvez seja a resposta de defesa a patógenos mais bem estudada nas plantas, as quais constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, sendo que diferentes famílias botânicas usam distintos produtos secundários como fitoalexinas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Seu papel na resistência a patógenos é amplamente estudado, sendo capazes de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos. Sua produção após a infecção sugere que um produto do patógeno ou da interação patógeno-hospedeiro esteja envolvido no desencadeamento da biossíntese de fitoalexinas, como carboidratos, proteínas ou lipídios (KUC, 1995; HAHN, 1996; SMITH, 1996; WULFF; PASCHOLATI, 1998 e 1999). A síntese de fitoalexinas pode ser induzida por compostos denominados eliciadores, os quais podem ser de origem microbiana (eliciador exógeno) ou da própria planta (eliciador endógeno). Quimicamente, os eliciadores bióticos são formados, de modo geral, por moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas e lipídios (PASCHOLATI; LEITE, 1995). No caso dos eliciadores endógenos, existem os fragmentos da parede celular das plantas (oligogalacturonídeos), os quais são liberados pela ação de enzimas degradadoras da parede, produzidas por fungos e bactérias ou pelas próprias células danificadas da planta. Além disso, as fitoalexinas podem se acumular nos tecidos em resposta a eliciadores abióticos, que causam estresse a planta, como a luz ultravioleta, metal pesado ou mesmo em consequência de ferimentos (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Atualmente, mais de 300 fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos e naturais como cumarinas, diterpenos, flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, dihidrofenantrenos, estilbenos, furanoacetilenos, antraquinonas, poliacetilenos e polienos. Foram identificadas em 40 famílias de angiospermas (BRAGA, 2008).

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

Sua ação nos fungos acontece por desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução do crescimento micelial. Ao contrário dos anticorpos produzidos pelos animais, as

fitoalexinas não são proteínas, não apresentam especificidade e não imunizam a planta (SNYDER; NICHOLSON, 1990; LO et al., 1996; LABANCA, 2002).

No caso do sorgo, são produzidos compostos fenólicos em resposta a inoculação com fungos patogênicos ou não, sendo que entre estes foram identificadas quatro fitoalexinas derivadas de antocianidinas (flavonóides-3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, apigeninidina, éster do ácido caféico de arabinosil 5-o-apigeninidina e 5-metoxiluteolinidina. Estas fitoalexinas são coloridas e são um modelo para este tipo de estudo. Essas substâncias são sintetizadas em mesocótilos e folíolos, sendo que nos folíolos o acúmulo é restrito a uma pequena área da epiderme, enquanto que nos mesocótilos formam-se grandes lesões ao longo do sítio de infecção, com inclusões de coloração laranja-marrom a avermelhadas (NICHOLSON et al., 1987; LO et al., 1996).

Alguns trabalhos têm indicado o potencial de produtos naturais em induzir fitoalexinas em bioensaios com mesocótilos estiolados de sorgo.

Pazuch et al. (2005), trabalhando com o extrato aquoso da planta medicinal *Artemisia camphorata* (cânfora), induziram a síntese de fitoalexinas em sorgo, cujo acúmulo chegou a ser 20 vezes superior ao valor da testemunha.

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

Meinerz et al. (2008), trabalhando com derivados do extrato aquoso de *Adiantum capillus-veneris* (avenca), observaram que no extrato aquoso de avenca autoclavado, a indução de fitoalexinas em sorgo na concentração de 40% do extrato de infusão e decocção, promoveu indução de 45 e 34 vezes, respectivamente, e a concentração de 20% de maceração promoveu indução de 40 vezes, em relação à testemunha água. Para o extrato não autoclavado, observou-se que a maior indução ocorreu na concentração de 40% para os três derivados, com indução de 69, 52 e 38 vezes maiores em relação à testemunha para decocção, infusão e maceração, respectivamente.

2.5. PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA

2.5.1. Peroxidases (EC 1.11.1.7)

A peroxidases são enzimas presentes nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, e são responsáveis por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (CAVALCANTI et al., 2005 b). A enzima peroxidase e suas isoformas apresentam várias funções na defesa vegetal celular, pela sua participação na hipersensibilidade, lignificação, suberização e metabolismo de parede celular e produção de fitoalexinas (KUHN, 2007), sendo classificada por Van Loon; Van Strein (1999) como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas–RP) pertencentes a família PR–9. 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 (TAIZ; ZEIGER, 2004). A lignina ou processo de lignificação pode interferir ou impedir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais através de estabelecimento de barreira mecânica e ao avanço e crescimento do patógeno, modificações químicas nas paredes celulares, tornando-se mais resistentes ao ataque de enzimas hidrolíticas e aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A peroxidase é uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação de 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). O funcionamento básico das peroxidases consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxilas anelado a um anel aromático. A reação clássica desta enzima é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (o-metoxi-fenol) (HIRAGA et al., 2001). Além disso, peroxidases têm sido relacionadas à uma variedade de processos

envolvidos na defesa, cujo interesse maior envolve o papel que elas desempenham no bloqueio de um patógeno (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

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

2.5.2. Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)

Polifenoloxidase (PFO) 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, 1987). São também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002). Estas enzimas são amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, sendo encontradas também em várias espécies de bactérias, numerosos fungos e algas (MAYER; HAREL, 1987).

As polifenoloxidasas 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., 1984). 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; BACKER, 1995; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004).

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

2.5.3. Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). A FAL é a primeira enzima do metabolismo de fenilpropanóides na maioria das plantas e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta à infecções (STRACK, 1997).

A FAL é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

A FAL é uma enzima largamente estudada por fisiologistas por causa de sua importância chave no metabolismo secundário das plantas. E em meio ao fenômeno da indução de resistência, também é uma das enzimas mais estudadas (KUHN, 2007). A FAL tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos e bactérias (XIANG; MOORE, 2005). 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 do indutor e que direcionaria para a produção de um produto final específico (DIXON; PAIVA, 1995).

2.5.4. Quitinases (EC 3.2.1.14)

As quitinases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilglicosamina). Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que a quitina mostra-se como um dos principais constituintes da parede celular fúngica. Além disso, a atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta a infecção e a tratamentos hormonais e químicos. Assim como as β -1,3-glucanases, as quitinases são agrupadas entre as “Proteínas Relacionadas à Patogênese” (Proteínas-RP) e exibem formas ácidas e básicas (MARTINS, 2008).

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

2.5.5 Proteínas

O conteúdo de proteínas no tecido vegetal desafiado com o patógeno ou tratado com eliciador indica a ativação dos mecanismos de defesa. É de suma importância a verificação das enzimas chaves na indução de resistência, porém deve-se considerar que aspectos fisiológicos também são alterados e a sinergia entre o metabolismo primário e secundário, assim como os compostos produzidos, agem de forma complexa na proteção de planta. Dessa forma, destaca-se a importância de estudos que demonstram o teor de proteínas solúveis nas plantas tratadas (VIECELLI, 2008).

Entre as proteínas, há as relacionadas à patogênese, as quais são induzidas nos tecidos vegetais em função da inoculação com patógeno/microrganismo, sistematicamente ou em partes destes, bem como pelo tratamento com agentes químicos (GUZZO, 2003). A ativação da síntese protéica leva a uma fase de resistência da planta (LARCHER, 2000).

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

2.6 POTENCIAL DE PLANTAS MEDICINAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Estima-se, atualmente, que apenas 20% da população mundial sejam responsáveis pelo consumo de 85% dos medicamentos industrializados disponíveis no mercado. No Brasil, somente 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto que o restante encontra nos medicamentos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996). Até o momento, ainda não se conhece quase nada sobre a composição química de quase 99% das plantas de nossa flora, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies (MING, 1996). Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários de plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foram estudados quanto suas atividades biológicas.

Plantas medicinais possuem compostos secundários (compostos não vitais às plantas, mas com função de proteção contra pragas, doenças e atração de polinizadores) de que tanto podem ter ação antimicrobiana direta (BENETT; WALLSGROVE, 1994), quanto ação eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (STANGARLIN et al., 1999). Estes compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, ligninas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinomas, xantonas, lactonas e esteróides entre outras (DI STASI, 1996). Quando esses compostos são extraídos das plantas por processos

específicos, como a destilação por arraste de vapor d'água, originam líquidos de consistência semelhante ao óleo, voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, denominados de óleos essenciais (SILVA et al., 1995). Quando esses compostos são extraídos pela ação de álcool sobre uma erva seca ou uma mistura de ervas secas originam as tinturas simples ou compostas, respectivamente (TESKE; TRENTINI, 1997).

O entendimento das propriedades elicitoras dos compostos secundários presentes nas plantas medicinais podem contribuir para a aquisição de novas técnicas de controle de doenças de plantas (BONALDO et al., 2004).

Na literatura é possível encontrar um grande número de trabalhos que utilizam as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários de plantas medicinais para o controle de agentes fitopatogênicos. Trabalhos desenvolvidos com o extrato bruto e óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos pela indução de fitoalexinas, denotando a presença de composto com características de eliciadores (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997; STANGARLIN et al., 1999; MOTOYAMA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Franzener et al. (2003) utilizaram o extrato bruto de cânfora (*Artemisia camphorata*) para induzir resistência à *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo e detectaram uma redução do número e tamanho da lesão em plantas tratadas com cânfora antes da inoculação do patógeno em relação às plantas não induzidas.

Carneiro (2003) avaliou extrato de folhas e óleo emulsionável de nim (*Azadirachta indica*) no controle de oídio de tomateiro, causado por *Oidium lycopersici*. Enquanto os extratos de folhas não foram efetivos no controle, o óleo emulsionável controlou a doença nos mesmos níveis que o fungicida recomendado para a cultura (triforine).

Formighieri et al. (2007), trabalhando com extrato aquoso de *Adiantum capillus-veneris* (avenca) no controle de fitopatógenos através da inibição da germinação de esporos dos fungos *Phakopsora euvtis* e *Pseudocercospora vitis*, do crescimento micelial de *Colletotrichum musae* e *Sclerotium rolfsii* e da multiplicação das bactérias *Erwinia* sp e *Bacillus subtilis*, observaram que o extrato obtido por maceração não

autoclavado foi o que promoveu maior efeito sobre *P. euvitis* e *P. vitis*, com redução de 75 e 100% na germinação de esporos na concentração de 20%, respectivamente. Verificaram ainda menor crescimento micelial de *C. musae* e *S. rolfsii*, por maceração autoclavado com redução de 39% e 83%, respectivamente. Para *Erwinia* sp., o tratamento que teve maior efeito inibitório foi o macerado autoclavado, que inibiu em até 99% o crescimento bacteriano, para *B. subtilis*, não houve inibição.

Bonaldo et al. (2007), trabalhando com eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) na atividade eliciadora de fitoalexinas em sorgo, observaram que o extrato bruto de *E. citriodora* induziu acúmulo de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. As maiores produções das fitoalexinas deoxiantocianidinas foram promovidas pelo patógeno *Colletotrichum sublineolum*, seguida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Vigo (2002) utilizou a tintura vegetal de *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro) no controle de *Microsphaeria diffusa* (oídio) em plantas de soja. Determinou um efeito indutor de resistência e fungitóxico de *P. glomerata* à *M. diffusa*, indicando o potencial desta planta medicinal no controle de oídio da soja.

Schwan-Estrada et al. (1997), utilizando os extratos de orégano (*Origanum vulgare*), cardo santo (*Argemone mexicana*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), manjerona (*Origanum majorana*), erva cidreira (*Lippia alba*), cânfora (*Artemisia camphorata*), pitanga (*Eugenia uniflora*), goiabeira (*Psidium guajava*), romã (*Punica granatum*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), mil-folha (*Achillea millefolium*) e poejo (*Mentha pulegium*), verificaram que estes extratos promoviam a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja. Os autores observaram que os extratos de pitanga, cânfora, poejo, romã e cardo santo promoveram a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo.

2.6.1 Avenca (*Adiantum capillus-veneris*)

A avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.), também conhecida como cabelo de Vênus, é uma planta medicinal perene, que cresce em locais onde a luz é escassa e a

umidade é abundante (BALMÉ, 1991). Pertencente à família Polypodiaceae é a mais comum do gênero (JOLY, 1993), originária da Inglaterra, Europa Central e Meridional. Possui compostos fenólicos como o ácido gálico, mucilagem, taninos, açúcares, carboidratos, diversos princípios amargos como a capilarina e pequena quantidade de óleo essencial (TESKE; TRENTINI, 1997). Também apreciada como planta ornamental pela sua folhagem verde e abundante, é usada como diurético e em tratamento de bronquite, encontrando boa aplicação contra tosse, catarro, afecções, rouquidão e queda de cabelos (NAKANE et al., 1999) (Figura 1).



Figura 2.1 Planta medicinal avenca (*Adiantum capillus-veneris*). Fonte: o autor.

A capacidade do extrato aquoso de avenca em causar acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo foi demonstrada por Meinerz et al. (2008), porém não é conhecida a natureza das moléculas elicitoras.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, p. 635, 1997.

BALMÉ, F. **Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus, 398 p. 1999.

BENNETT, R.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**. v. 127. p. 617-633, 1994.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMPRAPA-CNPDA. Documentos, 15. 388p. 1991.

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

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 128-34, 2004.

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

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 3 ed, 2001. 500p.

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

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, 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.

CARNEIRO, S. M. de T. P. G. Efeito de extratos de folhas de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**. v. 29, n. 3, p. 262-265, 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, 263p. 2005 a.

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

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

CONSTABEL, C. P.; BACKER, K. F. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington: v. 92, p. 407-411, 1995.

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

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. p. 109 -127. 1996.

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

FORMIGHIERI, A. P.; MEINERZ, C. C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillus-veneris* (L.) no controle de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu : v. 33, (Suplemento), p. 67, 2007.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, p. 503-507, 2003.

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

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

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

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

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Eds.). Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC – **Lewis Publishers**, p. 177-199. 1997.

HIJWEGWN T.; VERHAAR, M. A., ZADOKS J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dicloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, n. 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.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 11. ed. São Paulo: Nacional, p. 777 1993.

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.

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

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

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

KUHN, O. J. **Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. Marechal Cândido Rondon, 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2003.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*)**

contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). Piracicaba, Dissertação (Mestrado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2002.

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

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

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

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

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

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

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

MEINERZ, C. C.; FORMIGHIERI, A. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; DIETERICH, C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantumcapillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu: v. 10, n. 2, p. 26-31. 2008.

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

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência – Um guia de estudos multidisciplinar.** São Paulo: Universidade Paulista, p. 9-86. 1996.

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

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

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORITUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum**, v.25, n. 2, p. 491-6, 2003.

NAKANE, T. MAEDA, Y.; EBIHARA, H.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; TAKANO, A.; AGETA, H.; SHIOJIMA, K.; CAI, S. Q.; ABDEL-HALIM, S. B. Fern Constituents: Six New Triterpenoid Alcohols From *Adiantum capillus-veneris*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 543-547, 1999.

NAKASONE, A. K.; BETTIOL, W.; SOUZA, R. M. The effect of water extracts of organic matter on plants. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal: v. 25, n. 4, p. 330-335. 1999.

NICHOLSON, R. L.; KOLLIPARA, S. S.; VINCENT, J. R.; LYONS, P. C.; CADENA-GOMES, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 84, n. 16, p. 5520-5524, 1987.

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

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.

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

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Passado, presente e Futuro. **Summa Phytopathologica**, n. 19, v. 1, p. 53-54. 1993.

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

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

PAZUCH, D.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; ASSI, L. Efeito do congelamento e da incorporação de antioxidantes na atividade antifúngica e indutora de fitoalexinas do extrato aquoso de *Artemisia camphorata* (cânfora). In: **XIV Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC**, Guarapuava, 2005. (Resumos). Guarapuava: UNICENTRO, 2005.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, n.1, p.439-63, 1992.

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

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.

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

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

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., STANGARLIN, J. R., PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 22, suplemento, p. 346-346. 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, 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, p. 125-138. 2005.

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

SILVA, I.; FRANCO, S. L.; MOLINARI, S. L.; CONEGERO, C. I.; MIRANDA NETO, M. H.; CARDOSO, M. L. C.; SANDIANA, D. M. G.; IWANKO, N. S. **Noções sobre o**

organismo humano e utilização de plantas medicinais. Cascavel. Assoeste. p. 230, 1995.

SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R. M.; REZENDE, M. L. V.; CASTRO, R. M. Efeito do acibenzolar-S-methyl (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 735-744, 2001.

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

SNYDER, B. A.; NICHOLSON, R. N. Synthesis of phytoalexin in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. **Science**, v. 3, p. 86-90, 1990.

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

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.11, p.16-21, 1999.

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

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WEIDEMANN-MERDINOGLU, 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, F. **Fisiologia Vegetal**. Metabólitos secundários e defesa vegetal. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed. 13, p. 309-334. 2004.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de Fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Ed. Herbarium Laboratório Botânico, 317 p. 1997.

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.

THOMAS, M. B. Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 96, p. 5944-5951, 1999.

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

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn: v. 60, p. 106-112, 1988.

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

VIGO, S. C. **Controle de *Microsphaera diffusa* (oídio da soja) pelo uso da tintura vegetal da planta medicinal *Pfaffia glomerata* (Ginseng Brasileiro)**. Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia. Marechal Cândido Rondon PR. UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2002.

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

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

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

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, v. 9, p. 151-159, 1992.

4 CAPÍTULO I – INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO TRATADOS COM FRAÇÕES DE *Adiantum capillus-veneris* OBTIDAS POR SATURAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL

RESUMO

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A aplicação de extratos vegetais visando à indução de mecanismos de resistência é uma alternativa interessante ao controle químico, entretanto, nestes extratos podem ocorrer além da presença de indutores, a presença de supressores. Este trabalho teve por objetivo a purificação parcial, através precipitação com sulfato de amônio e de cromatografia de filtração em gel, de compostos presentes no decocto (EA) de *Adiantum capillus-veneris* (avenca) eficientes na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Extrato aquoso de *A. capillus-veneris* foi fracionado com diferentes concentrações de sulfato de amônio e essas frações foram submetidas à cromatografia de filtração em gel (CFG). Foram obtidos nove picos protéicos e um pico glicídico para EA 1% com massas moleculares variando de 0,61 à 0,01 KDa; na fração 0-20% foram obtidos dois picos protéicos (menores que 0,01 KDa) e dois glicídicos com concentração de açúcares variando de 4,1 a 17,5 μg de açúcares mL^{-1} ; na fração 20-40% houve três picos protéicos (111,5 à 0,98 KDa) e cinco glicídicos (11,3 a 73,7 μg de açúcares mL^{-1}); na fração 40-60% houve dois picos protéicos (111,5 à 0,09 KDa) e dois glicídicos (5,6 a 7, 5 μg de açúcares mL^{-1}); na fração 60-80% houve seis picos protéicos (menores que 0,02 KDa) e dois glicídicos (16,5 a 51,3 μg de açúcares mL^{-1}); e na fração 80-100% houve três picos protéicos (menores que 0,09 KDa). Mesocótilos de sorgo foram tratados com as frações provenientes da CFG, além do decocto a 1%, acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg L^{-1} do i.a. como eliciador de referência) e tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0. Após incubação por 96 h, efetuou-se avaliação dos teores de fitoalexinas a 480 nm de absorbância. O pico II (proteína com 0,09 KDa) do decocto mostrou-se eficiente na indução de fitoalexinas, sendo 6,68% superior a ASM.

Entre os cortes, o que melhor sobressaiu-se foi o corte 60-80% com um incremento de 76% em relação ao ASM. De acordo com os resultados obtidos pôde-se obter frações proteicas e/ou glicídicas com capacidade de induzir a síntese de fitoalexinas em sorgo de maneira superior ao extrato (decocto) do qual é originária, indicando o potencial dessas moléculas para trabalhos futuros com indução de resistência.

Palavras chaves: indução de resistência, avenca, deoxiantocianidinas.

INDUCTION OF PHYTOALEXINS IN SORGHUM MESOCOTYLS TREATED WITH FRACTIONS OF *Adiantum capillus-veneris* OBTAINED BY AMMONIUM SULPHATE FRACTIONATION AND GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Induction of resistance involves the activation of plant defense mechanisms in response to treatment with biotic or abiotic elicitors. The use of plant extracts to induce resistance mechanisms is an interesting alternative to chemical control, however, in these extracts may occur the presence of inducers and/or suppressors. This study aimed to partially purificate by ammonium sulphate fractionation and gel filtration chromatography compounds present in decoct of *Adiantum capillus-veneris* efficient in the induction of phytoalexins in sorghum mesocotyl. Decoct (EA) of *A. capillus-veneris* was precipitated with ammonium sulphate in concentration of 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100% and these fractions were subjected to gel filtration chromatography (GFC). To decoct were obtained nine protein peaks and one peak for carbohydrate with molecular weights ranging from 0.61 to 0.01 KDa; to fraction 0-20% were obtained two protein peaks less than (0.01 KDa) and two glucosic peaks with concentration of sugars ranging from 4.1 to 17.5 μg of sugar mL^{-1} ; to 20-40% were three protein peaks (0.98 to 111.5 KDa) and five glucosic peaks with concentration of sugars ranging from 11.3 to 73.7 μg of sugar mL^{-1} ; to 40-60% were obtained two protein peaks (0.09 to 111.5 KDa) and two glucosic peaks (5.6 to 7.5 μg of sugar mL^{-1}); to 60-80% were obtained six protein peaks (lower than 0.02 KDa) and two glucosic peaks (16.5 to 51.3 μg of sugar mL^{-1}); and to 80-100% were obtained three protein peaks with molecular weight equivalent to 0.09 kDa. Sorghum mesocotyl were treated with fractions from the GFC, decoct (1%), acibenzolar-S-methyl (ASM) (125 mg L^{-1} a. i. as elicitor reference) and sodium phosphate buffer (10 mM pH 6.0). After incubation for 96 h, the levels of phytoalexins produced was measured at 480 nm. The protein peak II (0,09 KDa) from decoct was effective in inducing phytoalexin, exceeding in 6,68% the induced got by ASM. Among the franction, what had better results,the fraction 60-80% increased 76% induction of

phytoalexin compared to ASM. According to the results was possible to obtain proteic and/or glucosic fractions capable to induce phytoalexins in sorghum better than the decoct from wich are derivated, showing the potential of these molecules for future researchs with resistance induction.

Key words: induction of resistance, mand hair, deoxyanthocianidins.

4.1 INTRODUÇÃO

Com o crescente desenvolvimento de tecnologias voltadas para a agricultura, são evidentes os incrementos na utilização de insumos, em especial de pesticidas. O uso de agroquímicos vem contribuindo para o aumento da produtividade agrícola, mas também tem sido responsável por efeitos adversos sobre o meio ambiente e a saúde humana (STANGARLIN et al., 1999). Além disso, o alto custo, o aumento da resistência dos fitopatógenos a esses produtos químicos (GHINI; KIMATI, 2000) e a conscientização do consumidor na procura de alimentos sem resíduos de pesticidas, têm levado à necessidade de se obter alternativas ao controle de doenças em plantas (NAKASONE et al., 1999).

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

Na agricultura alternativa são buscadas novas medidas de proteção entre elas a indução de resistência à que se baseia na ativação de mecanismos de defesa vegetal contra fitopatógenos para o controle de doenças em plantas (GHINI; KIMATI, 2000).

A indução de resistência, que consiste no aumento do nível de resistência pela ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta e sem qualquer alteração em seu genoma (ROMEIRO, 2008), é desencadeada por moléculas eliciadoras que podem ser de origem biótica (microrganismos viáveis ou inativos) (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007) ou abiótica (ácido aminobutírico; ácido salicílico; ácido jasmônico e acibenzolar-S-metil) (HIJWEGWN et al., 1996; COQUOZ et al., 1995; COOLS; ISHII, 2002).

Uma forma de defesa induzível amplamente estudada são as fitoalexinas, as quais constituem mecanismos de defesa eficientes em diversas interações planta-patógeno. As fitoalexinas apresentam natureza química variada, são antibióticos com baixa especificidade e seu modo de ação inclui diversos efeitos citológicos que

culminam na inibição do crescimento ou morte do patógeno (BRAGA, 2008). A síntese e o acúmulo de fitoalexinas, assim como ativação de outras respostas de defesa, ocorrem em resposta a um acúmulo, ou seja, ao reconhecimento de moléculas eliciadoras (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Em sorgo são conhecidas três fitoalexinas, denominadas flavonóides-3-deoxiantocianidinas (LO et al., 1996), as quais são sintetizadas em resposta a tentativa de penetração fúngica (SNYDER; NICHOLSON, 1990) ou ao tratamento com eliciadores. Portanto, a resistência induzida em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa em resposta ao tratamento com agentes eliciadores os quais são moléculas capazes de proteger contra infecções subseqüentes por patógenos (STANGARLIN et al., 1999).

Entre os eliciadores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). As plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003) como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta) (ITAKO et al., 2009).

A aplicação de extratos brutos de plantas medicinais (STANGARLIN et al., 2008) e microrganismos (KUHN, 2007; VIECELLI et al., 2009) já foi testada quanto a capacidade eliciadora e comprovada para inúmeros patossistemas, sendo efetivos no controle de várias doenças.

A avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.) é uma planta medicinal perene que possui compostos fenólicos, diversos princípios amargos como a capilarina e pequena quantidade de óleo essencial (TESKE; TRENTINI, 1997). A capacidade do extrato aquoso de avenca em causar acúmulo de fitoalexinas em sorgo foi demonstrada por Meinerz et al. (2008), porém ainda não é conhecida a natureza das moléculas eliciadoras.

A purificação parcial de compostos presentes em extratos brutos consiste numa forma prática de obter frações com características indutoras e com potencial para o desenvolvimento de produtos específicos altamente indutores. Em ensaios dessa natureza, mesocótilos de sorgo tem sido empregados como modelo de estudo, apresentando metodologia estabelecida e fitoalexinas caracterizadas. Dessa forma, no

presente trabalho buscou-se a purificação parcial, por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel, de compostos presentes em extrato bruto de avenca capazes de induzir a produção da fitoalexina deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo, buscando selecionar frações potencialmente eficientes para trabalhos futuros na indução de resistência à doenças em plantas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do decocto de *A. capillus-veneris*

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, no período de maio a novembro de 2009. As plantas de aveia, provenientes do município de Marechal Cândido Rondon/PR, foram coletadas no horto de plantas medicinais da UNIOESTE próximo ao meio dia. As folhas foram secas por 10 dias em ambiente sombreado e arejado à temperatura de 25 °C, trituradas em moinho de faca para obtenção do pó vegetal e conservadas em local fresco ao abrigo da luz, conforme metodologia proposta por Teske e Trentini (1997). O extrato aquoso foi obtido por decocção devido a melhor atividade eliciadora de fitoalexinas (MEINERZ et al., 2008). Na decocção colocou-se 1 g do pó em 100 mL de água destilada fria, aquecendo até a ebulição e deixando ferver por 1 min e, em seguida, reservou-se em recipiente fechado por 10 min.

4.2.2 Precipitação fracionada do decocto de aveia com sulfato de amônio

As proteínas presentes em 100 mL do decocto de aveia foram precipitadas em sulfato de amônio em saturações de 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100% (DI PIERO, 2003). O sal foi dissolvido gradativamente, sob agitação, com a solução mantida a 4 °C. Após dissolução do sal a solução foi centrifugada a 20.000 g por 25 min. As proteínas presentes em cada fração foram ressuspensas em 3,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e efetuada diálise contra água destilada no volume de 4 L (4 °C, 24 h, com três trocas de água). O volume final de cada fração foi ajustado para 10 mL.

4.2.3 Cromatografia de filtração em gel (CFG)

Para a cromatografia de filtração em gel, uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento) foi preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), formando um gel sedimentado de 45,6 cm³. Aplicou-se 1 mL do decocto ou de cada uma de suas precipitações com sulfato de amônio sobre o leito da coluna e eluiu-se com tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), sendo coletadas frações de 2 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹ (IURKIV, 2008). Efetuou-se o monitoramento da presença de proteínas das frações obtidas em espectrofotômetro a 280 nm. A presença de carboidratos foi monitorada como descrito por Lever (1972). Cada fração obtida (em um total de até 80 frações) foi testada individualmente para os ensaios de fitoalexinas.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada utilizando-se uma curva de calibração. Para proteína a curva foi construída plotando-se em um gráfico o log das massas moleculares das proteínas padrão albumina de soro bovino (66 KDa); anidrase carbônica (29 KDa) e bacitracina (1,45 KDa) e o quociente do volume de eluição destas proteínas, pelo “void volume” (Ve/Vo) (FIORI-TUTIDA, 2003). A curva padrão de açúcares redutores (glicose) foi obtida pelo método de Lever (1972).

4.2.4 Bioensaio para produção de fitoalexinas em mesocótilo de sorgo

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cultivar BRS 610, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% (15 min), lavadas em água destilada e embebidas em água sob temperatura ambiente por 6 h. Após esse período, foram enroladas em folhas de papel de germinação, umedecidas com água destilada, e incubadas em escuro a 28 °C por 4 dias. As plântulas formadas foram inicialmente expostas à luz por 4 h para paralisar a elongação dos mesocótilos (NICHOLSON et al., 1988).

Para o teste de produção de fitoalexinas, os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos para microcentrifuga (volume de 1,5 mL),

sendo três mesocótilos/tubo, contendo uma alíquota de 1,4 mL do decocto de aveia, de seus precipitados com sulfato de amônio (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%), e de suas frações obtidas por CFG. Como padrões utilizou-se água destilada, tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e acibenzolar-S-metil (ASM: 125 mg L⁻¹ do i.a.) (OSSWALD et al., 2004). Os tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25 °C sob luz fluorescente (WULFF; PASCHOLATI, 1999). Após 60 h, os mesocótilos foram retirados dos tubos, secos e os 0,5 cm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5 cm) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em tubo para microcentrifuga contendo 1,5 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4 °C no metanol por 96 h para extração dos pigmentos. A absorbância foi determinada a 480 nm em espectrofotômetro UV-VIS (NICHOLSON et al., 1988).

4.2.5 Análise dos resultados

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, submetidos à análise de variância e aplicado teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) quando pertinente. O programa utilizado para análise estatística foi o software livre Sisvar (Versão 5.0).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Purificação parcial por CFG

Os resultados de purificação parcial do decocto de avenca e seus precipitados com sulfato de amônio são apresentados na Figura 4.1 e Tabela 4.1. Para o decocto obteve-se nove picos protéicos e um pico glicídico. Com relação aos picos protéicos as massas moleculares variaram de 0,61; 0,09; 0,01 KDa para os picos I, II e III respectivamente, e para os demais picos de proteína a massa molecular foi inferior a 0,01 KDa. A concentração de açúcar redutor no pico glicídico foi de $57 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4.1 A e Tabela 4.1). Nos precipitados com sulfato de amônio 0-20% obteve-se dois picos protéicos e dois picos glicídicos, cujas massas moleculares foram menores que 0,01 KDa e a concentração de açúcares redutores foi de 17,5 e $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4.1 B e Tabela 4.1).

No precipitado 20-40% obteve-se três picos protéicos e cinco picos glicídicos (Figura 4.1 C), onde as massas moleculares foram 111,5 e 0,98 KDa para os picos protéicos I e II, e os demais foram menores que 0,01 KDa (Tabela 4.1). Para os picos glicídicos a concentração de açúcares redutores variou de 11,3 a $73,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4.1 C).

Para o precipitado com saturação de 40-60% de sulfato de amônio (Figura 4.1 D) obteve-se dois picos protéicos com massas moleculares de 111,5 a 0,09 KDa, e dois picos glicídicos com concentração de açúcares redutores de 5,6 e $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 4.1).

No precipitado 60-80%, obteve-se seis picos protéicos com massa molecular menor que 0,02 KDa e dois picos glicídicos, com concentração de açúcar redutor de 51,3 e $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4.1 E). Para o precipitado 80-100% obteve-se três picos protéicos (Figura 4.1 F), com massa molecular menor que 0,09 KDa (Tabela 4.1).

Na literatura não há nenhum relato de trabalho visando à obtenção de fração biologicamente ativa a partir de derivados de avenca. No entanto, a técnica de cromatografia de filtração em gel tem sido utilizado para outros agentes.

Fiori–Tutida (2003), realizando cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de filtração em gel de extratos de dois isolados de *Lentinula edodes*, obteve 23 picos protéicos para o isolado LE 96/17 e 15 picos para o isolado LE 95/01, comprovando a eficiência de método na purificação dos extratos aquosos de basidiocarpos desse fungo. Neste trabalho foram obtidos a partir do isolado LE 96/17 massas moleculares variando de 0,2 a 75,0 KDa na fração A (I a V); 1,2 a 75,0 KDa na fração B (I e II); 1,0 a 78,0 KDa na fração C (I a V); 0,2 a 72,0 KDa na fração D (I a V); 1,0 a 66,0 KDa na fração E (I a IV) e 1,4 a 1,9 KDa na fração F (I e II). Para o isolado LE 95/01 foram obtidos massas moleculares variando de 0,2 a 73,0 KDa na fração A (I a V); 1,0 a 1,5 KDa na fração B (I e II); 1,1 a 1,4 KDa na fração C (I e II); 1,4 a 1,7 KDa na fração D (I e II); 1,6 a 74,0 KDa na fração E (I e II) e 1,9 a 80,0 KDa na fração F (I e II).

Iurkiv (2008), realizando cromatografia de filtração em gel com extrato bruto do basidiocarpo *Pycnoporus sanguineus* precipitado com sulfato de amônio, obteve eficiência quanto à purificação parcial por cromatografia de filtração em gel, podendo selecionar quatro frações protéicas III, IV e V, além da fração de carboidratos como potenciais indutores de resistência em soja, cujas massas moleculares variaram de 1,82 a 5,18 KDa.

Di Piero (2003), trabalhando com extrato aquoso de *L. edodes* e cromatografia de troca iônica, obtendo seis picos protéicos a partir da aplicação de fração precipitada com saturação de 40-80% de sulfato de amônia, cujas massas moleculares foram de 29 a 35 KDa.

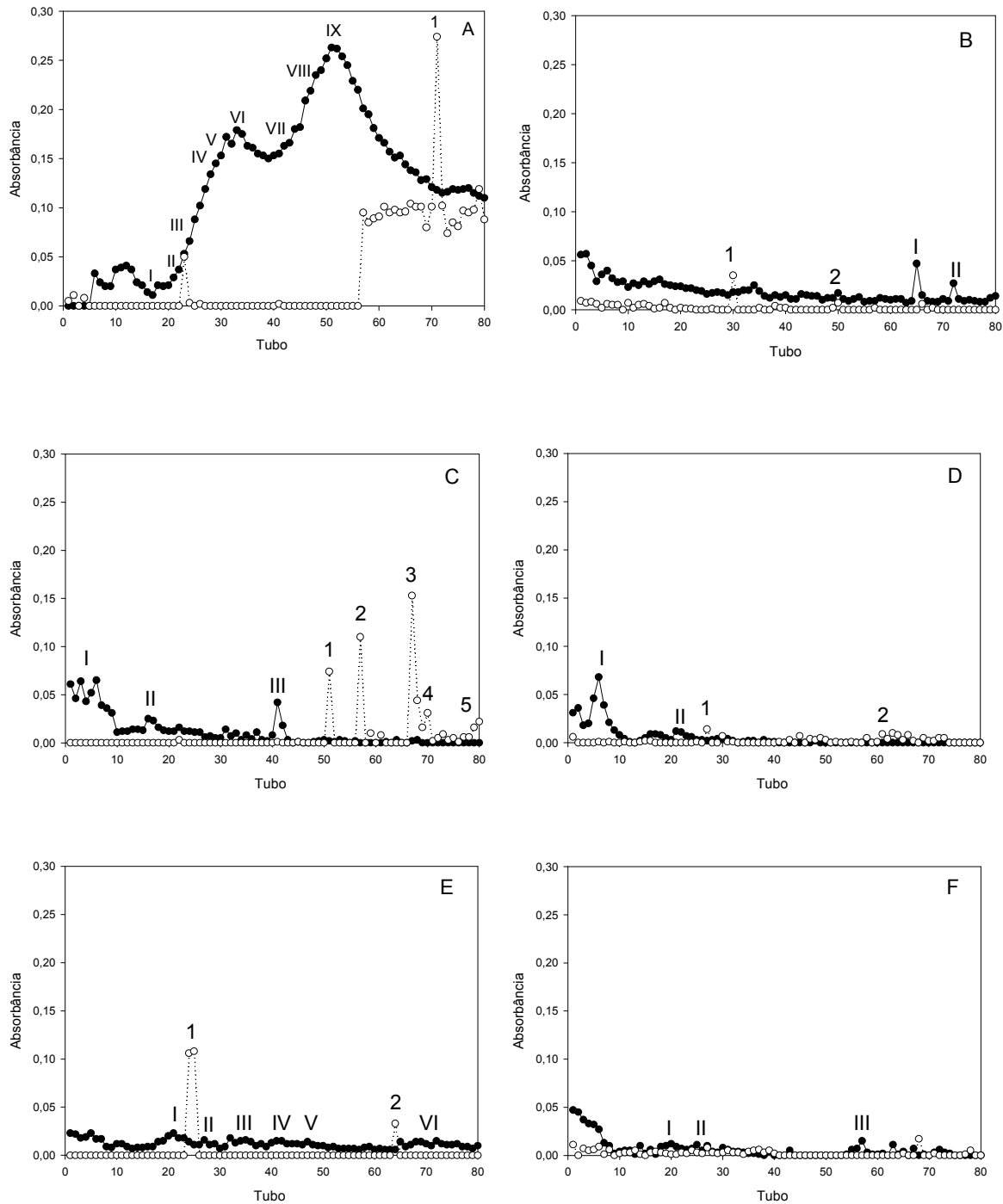


Figura 4.1 Frações protéicas (-●-: absorvância a 280 nm) e glicídicas (-○-: absorvância a 410 nm) de decocto de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) a 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel em coluna de vidro (1 cm x 30 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), e eluido com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0, sendo coletadas frações de 2 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente.

Tabela 4.1 Massa molecular e concentração de açúcares redutores de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel do decocto de *Adiantum capillus-veneris* e de seus respectivos cortes com sulfato de amônio (SA).

Tratamentos	Fração	Proteínas ¹	Concentração de açúcares redutores $\mu\text{g de glicose mL}^{-1}$) ²
		Massas Moleculares (KDa)*	
Extrato Bruto	I	0,61	
	II	0,09	
	III	0,01	
	IV	<0,01	
	V	<0,01	
	VI	<0,01	
	VII	<0,01	
	VIII	<0,01	
	IX	<0,01	
	1		57
Corte 0-20% c/ SA	I	<0,01	
	II	<0,01	
	1		17,4762
	2		4,1428
Corte 20-40% c/ SA	I	111,5	
	II	0,98	
	III	<0,01	
	1		36,0476
	2		53,1905
	3		73,6667
	4		15,5714
	5		11,2857
Corte 40-60% c/ SA	I	111,5	
	II	0,09	
	1		7,4769
	2		5,5714
Corte 60-80% c/ SA	I	0,02	
	II	<0,01	
	III	<0,01	
	IV	<0,01	
	V	<0,01	
	VI	<0,01	
	1		51,2857
	2		16,5238
Corte 80-100% c/ SA	I	0,09	
	II	<0,01	
	III	<0,01	

*¹ Massa molecular obtida com a curva de calibração $y = 1874,9^{-3,3594 x}$; onde o $V_0 = 14,2 \text{ ml}$;

² Quantificação pelo método de Lever (1972), pela curva de calibração $y = 0,0021x - 0,0017$.

4.3.2 Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

Os resultados de indução para o decocto de avenca e seus precipitados com sulfato de amônio podem ser observados na Tabela 4.2. O decocto de avenca (EA 1%) e os precipitados com SA foram semelhantes as testemunhas água destilada e tampão, indicando ausência de atividade indutora.

Meinerz et al., (2009) trabalhando com indução de fitoalexinas em sorgo e soja tratados com precipitados com sulfato de amônia (0-20; 20-40; 40-60; 60-80 e 80-100%), obtidas de *Eucalyptus citriodora*, verificaram que em sorgo o maior acúmulo de fitoalexinas foi obtido com ASM (6 x superior a testemunha), seguido extrato não autoclavado do precipitado de 40-60% (3,9 vezes) e extrato autoclavado do precipitado 0-20% (3 vezes). Em soja, maior indução foi promovida por células de *Saccharomyces boulardii* que foi duas vezes superior a testemunha, enquanto que os extratos autoclavados e não autoclavados e todas as seis frações forma iguais a testemunha, indicando a ausência de indução de gliceolina por esses materiais.

Di Piero (2003), avaliando o efeito de precipitados obtidos a partir do extrato bruto de basidiocarpos de *Lentinula edodes* sobre antracnose em plântulas de pepino, verificou que no precipitado com 40-80% de sulfato de amônio houve um efeito significativo na concentração de açúcares redutores com $141,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, na concentração de proteínas, com $3628,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e no efeito protetor nas plântulas de pepino para controle da antracnose.

A indução de fitoalexinas para as frações obtidas por CFG do decocto e de seus precipitados com sulfato de amônio pode ser observada na Figura 4.2. Para o decocto (Figura 4.2A), o eliciador de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) não diferiu estatisticamente do tratamento EA 1%, e dos picos proteicos e glicídico pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), enquanto o tampão fosfato de sódio foi semelhante aos picos IV, V, VII, VIII e IX e inferiores aos demais picos estudados. O ASM não promoveu incremento na atividade em relação ao EA, porém, diferiu da testemunha tampão.

Na Figura 4.2B são apresentados os dados de indução de fitoalexinas das frações de CFG do precipitado com saturação de sulfato de amônio 0-20%, onde o

ASM foi superior ao EA 1%, ao corte 0-20% e aos demais picos protéicos e glicídico, enquanto o tampão não diferiu estatisticamente dos demais.

Para as frações de CFG do precipitado com saturação de sulfato de amônio 20-40% (Figura 4.2C) o ASM foi estatisticamente superior ao EA 1%, ao corte 20-40% e a todos os picos estudados, enquanto, o tampão diferiu somente do pico II. Este promoveu incremento na atividade de até 50,6% em relação ao decocto e ao precipitado 20-40%, indicando assim, a presença de uma fração indutora.

Na Figura 4.2D, todos os picos protéicos e glicídicos tiveram atividade menor do que o precipitado com saturação de sulfato de amônio 40-60%, atingindo 79,6% de redução da atividade, indicando possivelmente um efeito supressor dos cortes e/ou não recuperação de compostos responsáveis pela atividade na separação pela CFG.

Os precipitados com saturação de sulfato de amônio 60-80% e 80-100%, mostraram-se superiores ao ASM, tampão fosfato de sódio, EA 1%, e todos os picos protéicos e glicídicos estudados (Figura 4. 2 E e F). Entretanto, Figura 4. 2 E, o corte 60-80% promoveu uma atividade superior ao ASM, com incremento de 75,9% na atividade indutora. O método de purificação de eliciadores utilizado tem sido relatado para outros trabalhos.

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

Wulff; Pascholati (1999) utilizam CFG para obter frações purificadas e caracterizar parcialmente um eliciador de fitoalexinas em sorgo a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores verificaram que os picos 2 e 3 tinham proteína e carboidrato e massa molecular aproximada entre 18,4 e 25 KDa.

Moreira et al. (2008), buscando a purificação e caracterização parcial de um eliciador de fitoalexinas em sorgo e soja por cromatografia de filtração em gel a partir de extratos metanólicos e etanólicos de citronela (*Cymbopogon nardus*), obtiveram três frações a partir do extrato metanólico (FMI, FMII e FMIII) e duas frações para o extrato

etanólico (FEI e FEII), cujas massas moleculares para as frações foram FMI 69,29 KDa; FMII 40,51 KDa; FMIII 18,72 KDa; FEI 65,89 KDa e FEII 24,11 KDa. Quanto ao acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja não verificaram efeito significativo das frações FMI; FMII; FMIII; FEI e FEII. Entretanto, observaram efeito significativo das frações sobre a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, onde os maiores acúmulos destas fitoalexinas foram promovidas pelas frações FMI e FMIII. Para as fitoalexinas do sorgo, a fração metanólica FMIII foi também a que apresentou a maior produção de fitoalexinas e a fração etanólica FEII a que induziu a menor síntese dessas fitoalexinas.

Outros trabalhos, com extratos vegetais, utilizados no entanto, na forma bruta, tem indicado o potencial indutor de fitoalexinas em sorgo.

Bonaldo et al. (2007), trabalhando com eucalipto (*Eucalyptos citriodora*) na atividade eliciadora de fitoalexinas em sorgo, observaram que o extrato bruto de *E. citriodora* induziu acúmulo de deoxiantocianidinas.

Schwan-Estrada et al. (1997), utilizando os extratos de orégano (*Origanum vulgare*), cardo santo (*Argemone mexicana*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), manjerona (*Origanum majorana*), erva cidreira (*Lippia alba*), cânfora (*Artemisia camphorata*), pitanga (*Stenocalyx michelli*), goiabeira (*Psidium guajava*), romã (*Punica granatum*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), mil-folha (*Achillea millefolium*) e poejo (*Mentha puleguim*), verificaram que estes extratos promoviam a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja. Os autores observaram que os extratos de pitanga, cânfora, poejo, romã e cardo santo promoveram a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo.

Stangarlin et al. (1999) avaliaram a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo quando aplicados diferentes extratos de plantas e observaram que extrato de romã (*Punica granatum*), erva cidreira (*Lippia alba*), manjerona (*Origanum majorana*), babosa (*Aloe vera*), orégano (*Origanum vulgare*), foram eficientes na indução de fitoalexinas 3–deoxiantocianidinas em sorgo.

Rodrigues et al. (2007), trabalhando com extrato bruto aquoso (EBA) de gengibre (*Zingiber officinalis*) na atividade eliciadora de fitoalexinas em soja e sorgo, verificaram que o EBA de gengibre, nas diferentes concentrações, apresentou comportamento

diferenciado em relação às capacidades de indução de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas e gliceolina, que ocorreu de maneira dose-dependente, indicando que o extrato bruto de gengibre possui a capacidade de ativar mecanismos de defesa nessas plantas.

Vigo (2002) usou em seu trabalho tintura vegetal de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) com seis concentrações (0,1; 1; 5; 10; 20 e 25%) na produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e observou que houve um aumento na produção desses pigmentos, ficando inferior a este apenas o tratamento com tintura autoclavada a 0,1%. Não houve diferença significativa entre a produção de fitoalexinas com tintura autoclavada e não autoclavada. Dessa forma constatou que a tintura não perdeu seu poder eliciador quando submetido a altas temperaturas. A autora também observou um aumento gradativo na síntese de fitoalexinas com o incremento nas concentrações de tintura.

Franzener (2002), utilizando extrato de cânfora (*Artemisia camphorata*) autoclavado e não autoclavado; com e sem incorporação de antioxidante ao extrato de cânfora, com seis concentrações (0,1; 1; 5; 10; 20 e 25%), observou que o estímulo na produção de fitoalexinas foi crescente com o aumento da concentração do extrato vegetal, sendo que os tratamentos não autoclavados apresentaram uma indução superior aos tratamentos autoclavados. Para o bioensaio de fitoalexinas em sorgo com a incorporação de antioxidante (sulfito de sódio anidro) na concentração de 0,25%, ao extrato aquoso de cânfora, o autor verificou que a indução de fitoalexinas foi favorecido com a presença do antioxidante no extrato, indicando que tem potencial de induzir a resistência de plantas a patógenos.

Tabela 4.2 Concentração proteica e de açúcares redutores em frações do decocto de *Adiantum capillus-veneris*, obtidas na precipitação com sulfato de amônio e seu efeito na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Tratamento	Concentração de Proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	Concentração de açúcares redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Síntese de Fitoalexinas (Abs. 480 nm gpf^{-1} grama de peso fresco) ³
EA 1% ⁴	8,152	148,904	1,0 b
p0-20%	0,129	30,809	0,60 b
p20-40%	0,183	14,619	1,20 b
p40-60%	0,105	22,238	0,40 b
p60-80%	0,179	13,19	1,0 b
p80-100%	0,167	10,80	1,20 b
ASM ⁵	-	-	7,80 a
Tampão Fosfato de Sódio 0,01 M (pH 6.8)	-	-	1,80 b
Água Destilada	-	-	1,40 b

¹ Quantificação pelo método de Bradford (1976), variação de absorbância/ minuto de reação/grama de peso fresco ou por miligrama de proteína;

² Quantificação pelo método de Lever (1972);

³ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5 % de probabilidade;

⁴ Decocto de *Adiantum capillus-veneris*;

⁵ Acibenzolar-S-metil (125 mg i.a. L^{-1}).

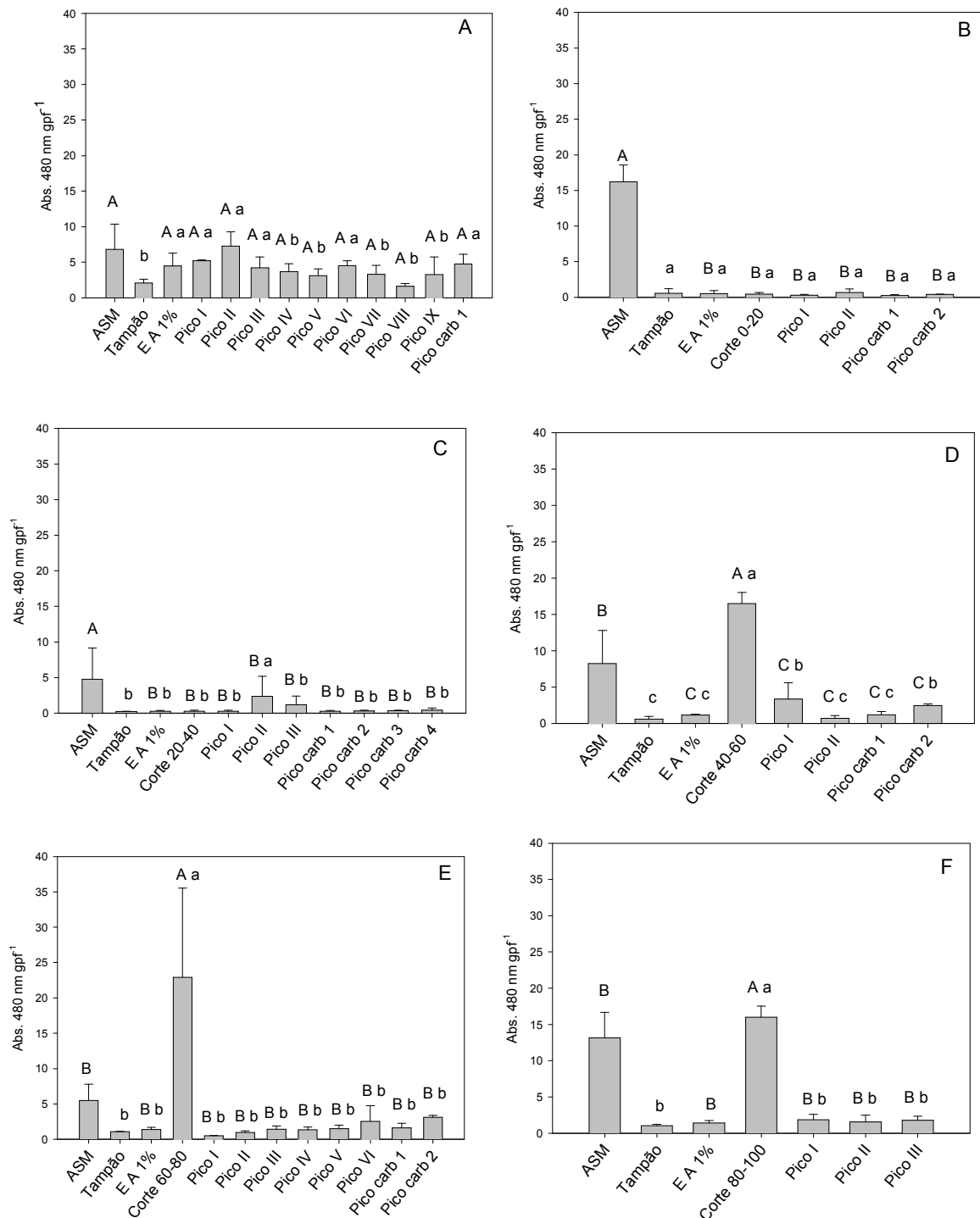


Figura 4.2 Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel, na atividade de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula para comparação com ASM e minúsculas para comparação com tampão não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 37,35.

Cortes 0-20% até 80-100% representam precipitados protéicos e glicídicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EA 1%: decocto de avenca 1%. Tampão: fosfato 0,01 M (pH 6,0). ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente.

4.4 CONCLUSÃO

Foi possível, através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel, purificar parcialmente compostos eliciadores a partir de decocto de *A. capillus-veneris*, capazes de induzir a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngicas e elicitoras de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 383-387. 2007.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba-SP. Ed. FEALQ. v. 13. p. 305-346. 2008.

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

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

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

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v. 30, p. 57-62. 2004.

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

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

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

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

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

ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO Jr., J. B.; CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 75-83, 2009.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Marechal Cândido Rondon PR. UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2008.

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

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

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

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

MEINERZ, C. C.; FORMIGHIERI, A. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; DIETERICH, C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avena (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.10, n.2, p.26-31. 2008.

MEINERZ, C. C.; FRANZENER, G.; MOURA, G.S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Atividade de fitoalexinas em sorgo e soja tratados com frações obtidas de *Eucalyptus citriodora*. **Tropical Plant Pathology** (Suplemento). v. 34, p. 46-46. 2009.

MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Caracterização e purificação parcial de frações obtidas de extrato de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 332-337. 2008.

NAKASONE, A. K.; BETTIOL, W.; SOUZA, R. M. The effect of water extracts of organic matter on plants. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 330-335. 1999.

NICHOLSON, R.L. et al. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 271-278, 1988.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 22, p. 417- 453. 1995.

RODRIGUES, E. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128. 2007.

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, (Suplemento), p. 346-346. 1997.

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.; ROMERO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ,. p. 125-138. 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 54-56. 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed) Piracicaba-SP. Ed. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. FEALQ. v. 13. p. 227-248. 2008.

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

SNYDER, B. A.; NICHOLSON, R. N. Synthesis of phytoalexin in sorghum as a site-specific responses to fungal ingress. **Science**, v. 3, p. 86-90. 1990.

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

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. 11, p. 16-21. 1999.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 16, p.265-304. 2008.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Ed. Herbarium Laboratório Botânico, 317p. 1997.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**. v. 34, n. 2 p. 87-96. 2009.

VIGO, S. C. **Controle de *Microsphaera diffusa* (oídio da soja) pelo uso da tintura vegetal da planta medicinal *Pfaffia glomerata* (Ginseng Brasileiro)**. Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia. Marechal Cândido Rondon PR. UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2002.

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

**5 CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM
SORGO POR FRAÇÕES OBTIDAS DA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE
AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL A PARTIR DE *Adiantum
capillus-veneris***

RESUMO

A utilização de extratos de plantas medicinais já foi testada quanto a capacidade para induzir resistência em inúmeros patossistemas. Dentre estes destaca-se a utilização de derivados do extrato de *Adiantum capillus-veneris* (avenca) na atividade eliciadora de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. Entretanto, a utilização dos mesmos pode não apresentar resultados satisfatórios devido à heterogeneidade de compostos presentes, muitos deles supressores de mecanismos de resistência. Dessa forma, o presente trabalho, objetivou a purificação parcial, por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel (CFG), de compostos presentes em decocto de *Adiantum capillus-veneris*, capazes de induzir a atividade das enzimas relacionadas à defesa peroxidases, polifenoloxidasas, quitinase e fenilalanina amônia-liase em sorgo. Decocto de *Adiantum capillus-veneris* (EA 1%) foi precipitado com concentrações de sulfato de amônio de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% e esses “cortes” ou frações foram submetidas à CFG. As frações protéicas ou glicídicas obtidas por CFG foram aplicadas em mesocótilos de sorgo e, após 96 h, as folhas desses mesocótilos foram coletadas para as análises bioquímicas. Acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg L^{-1} do i.a.) foi utilizado como padrão para indução. As amostras de folha de sorgo foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e utilizados para verificar a atividade de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e quitinase. Para peroxidase o pico IV (menor que 0,01 KDa) do EA 1% incrementou 21% a atividade em relação a testemunha água e 44% ao ASM. Para os precipitados 0-20% o pico protéico II (menor que 0,01 KDa) promoveu incremento de 39% na atividade em relação ao corte 0-20% e 19% para o EA 1%. O precipitado 80-

100% foi superior 89% ao ASM. Para polifenoloxidase o pico protéico VI (menor que 0,01 KDa) do EA1% reduziu 88% a atividade em relação ao ASM. Para fenilalanina amônia-liase o pico protéico II (menor que 0,01 KDa) do corte 0-20% foi 91% superior ao EA 1%. Para quitinase o pico protéico IV (menor que 0,01 KDa) do EA 1% foi 68% superior ao ASM. Foi possível induzir mecanismos de defesa em sorgo pela aplicação de frações parcialmente purificadas de *A. capillus-veneris*, o que pode permitir o desenvolvimento de novas moléculas e de métodos alternativos para controle de doenças em plantas.

Palavras chaves: avenca, indução de resistência, peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinase.

INDUCTION OF DEFENSE-RELATED PROTEINS IN SORGHUM FRACTIONS OBTAINED BY THE FRACTIONATION WITH AMMONIUM SULPHATE AND GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY FROM *Adiantum capillus-veneris*

ABSTRACT

The use of extracts from medicinal plants have been tested for elicitor in many pathosystems, being effective in controlling various diseases. As example we have the extract of *Adiantum capillus-veneris* as inductor of phytoalexins in cotyledons of soybean and sorghum mesocotyls. However, their use can not provide satisfactory results due to the heterogeneity of compounds and due the presence of suppressor mechanisms of resistance. Thus this study aimed to partially purificate by fractionation with ammonium sulphate and gel filtration chromatography (GFC), compounds present in decoct of *A. capillus-veneris*, capable to induce the activity of defense-related enzymes peroxidase, polyphenoloxidase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in sorghum. Decoct of *Adiantum capillus-veneris* was fractionated with ammonium sulphate in concentration of 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100% and these fraction were use for GFC. The proteic and glucosic fraction from GFC were used for treated sorghum mesocotyls and, after 96 h, the leaves of these ones were samples and used for biochemical analyses. Acibenzolar-S-methyl (ASM) (125 mg L⁻¹ a.i.) was used of pattern for induction. Samples of leaves were homogenized in 4 mL of sodium phosphate buffer 0.01 M (pH 6.0) and used to verify the activity of peroxidase (POX), polyphenoloxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chitinase (CHI). To POX the peak IV (lower than 0,01 KDa) increased 21% the activity compared to control water, and 44% compared to ASM. For the fraction 0-20% the protein peak II (lower than 0,01 KDa) increased 39% the activity in relation to the fraction 0-20% and 19% in relation to decoct. The fraction, 80-100% increased 89% compared to, ASM. For the PPO the peak VI (lower than 0,01 KDa) from decoct decreased 88% the activity compared to ASM. For PAL the peak II (lower than 0,01 KDa) from fraction 0-20% was 91% higher than decoct. For CHI 1% peak IV (lower than 0,01 KDa) from decoct was

68% higher than the ASM. It was possible to induce defense mechanisms in sorghum by the application of partially purified fractions of *A. capillus-veneris*, which can allow the development of new molecules and alternative methods to control plant diseases.

Key words: maind hair, resistance induction, peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase.

5.1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a agricultura tem buscado máxima potencialidade de produção com a aplicação de pesticidas para o controle de pragas e doenças em plantas. Isso se traduz pelo acúmulo de resíduos tóxicos ao longo da cadeia trófica, com impactos em longo prazo e danos a flora e a fauna, bem como às atividades produtivas diretamente dependentes do uso de recursos naturais, à vida selvagem, a piscicultura, aos insetos benéficos e mesmo ao homem (STANGARLIN et al., 2008).

Atualmente, com a agricultura alternativa buscam-se novas medidas de proteção, como a indução de resistência, que é a ativação de mecanismos de defesa vegetal a fitopatógenos, para o controle de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005). A indução de resistência, que consiste no aumento do nível de resistência pela ativação de mecanismos de defesa latentes na própria planta e sem qualquer alteração em seu genoma (ROMEIRO, 2008), é desencadeada por moléculas eliciadoras que podem ser de origem biótica (DI PIERO et al. 2004; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; SILVA et al., 2007) ou abiótica como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (HIJWEGWN *et al.*, 1996), acibenzolar-S-metil e silicatos (PEREIRA et al., 2009), além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico e fosfitos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005). A natureza dessas moléculas eliciadoras é variável, sendo comuns proteínas, glicoproteínas, carboidratos e lipídios (DI PIERO et al., 2004).

A ativação de mecanismos de resistência pode ocorrer pela indução de fitoalexinas, proteínas relacionadas a defesa como peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases, β -1,3-glucanases, lignificação, formação de papilas e halos, entre outros (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

A utilização de extratos brutos de plantas medicinais (SCHWAN-ESTRADA et al.; 2003; STANGARLIN et al., 2008; CARVALHO et al., 2008) e de microrganismos (KUHN, 2007; PEITER-BENINCA et al., 2008; VIECELLI et al., 2009) já foi testada quanto a capacidade eliciadora e comprovada para inúmeros patossistemas, sendo efetivos no controle de várias doenças. Dentre estes destaca-se a utilização de derivados (infusão, maceração e decocção) do extrato bruto de *Adiantum capillus-*

veneris (avenca) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo (MEINERZ et al., 2008) e na atividade antimicrobiana contra *Phakopsora euvitidis*, *Pseudocercospora vitis*, agente causal da ferrugem da uva e mancha das folhas em videira, respectivamente, *Colletotrichum musae* e *Sclerotium rolfsi*, agente causal da antracnose em banana e da murcha de sclerotium da soja, respectivamente e das bactérias *Bacillus subtilis* e *Erwinia* sp isoladas de sementes de soja e frutos de pimentão, respectivamente (FORMIGHIERI et al., 2007). Isto demonstra, portanto, o potencial da planta *A. capillus-veneris* na indução de resistência em soja e sorgo e no controle de fitopatógenos fúngicos e bacterianos.

A purificação parcial de compostos presentes em extratos brutos consiste numa forma prática de obter frações com características indutoras e com potencial para o desenvolvimento de produtos específicos altamente indutores (DI PIERO, 2003; FIORITUTIDA, 2003). Dessa forma, no presente trabalho, buscou-se a purificação parcial, por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel, de compostos presentes em extrato bruto de *A. capillus-veneris* capazes de induzir a atividade das enzimas relacionadas à defesa peroxidases, polifenoloxidasas, quitinase e fenilalanina amônia-liase em sorgo, buscando selecionar frações potencialmente eficientes na indução de resistência nesta cultura, estabelecendo assim, um modelo de estudo para futuras pesquisas com moléculas eliciadoras.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do decocto de *A. capillus-veneris*

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, no período de maio a novembro de 2009. As plantas de avenca, provenientes do município de Marechal Cândido Rondon/PR, foram coletadas no horto de plantas medicinais da UNIOESTE próximo ao meio dia. As folhas foram secas por 10 dias em ambiente sombreado e arejado à temperatura de 25 °C, trituradas em moinho de faca para obtenção do pó vegetal e conservadas em local fresco ao abrigo da luz, conforme metodologia proposta por Teske e Trentini (1997). O extrato aquoso foi obtido por decocção devido a melhor atividade eliciadora de fitoalexinas (MEINERZ et al., 2008). Na decocção colocou-se 1 g do pó em 100 mL de água destilada fria, aquecendo até a ebulição e deixando ferver por 1 min e, em seguida, reservou-se em recipiente fechado por 10 min.

5.2.2 Precipitação fracionada do decocto de avenca com sulfato de amônio

As proteínas presentes em 100 mL do decocto de avenca foram precipitadas em sulfato de amônio em saturações de 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100% (DI PIERO, 2003). O sal foi dissolvido gradativamente, sob agitação, com a solução mantida a 4 °C. Após dissolução do sal a solução foi centrifugada a 20.000 g por 25 min. As proteínas presentes em cada fração foram ressuspensas em 3,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e efetuada diálise contra água destilada no volume de 4 L (4 °C, 24 h, com três trocas de água). O volume final de cada fração foi ajustado para 10 mL.

5.2.3 Cromatografia de filtração em gel (CFG)

Para a cromatografia de filtração em gel, uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento) foi preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), formando um gel sedimentado de 45,6 cm³. Aplicou-se 1 mL do decocto ou de cada uma de suas precipitações com sulfato de amônio sobre o leito da coluna e eluiu-se com tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), sendo coletadas frações de 2 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹ (IURKIV, 2008). Efetuou-se o monitoramento da presença de proteínas das frações obtidas em espectrofotômetro a 280 nm. A presença de carboidratos foi monitorada como descrito por Lever (1972). Cada fração obtida (em um total de até 80 frações) foi testada individualmente para os ensaios de fitoalexinas.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada utilizando-se uma curva de calibração. Para proteína a curva foi construída plotando-se em um gráfico o log das massas moleculares das proteínas padrão albumina de soro bovino (66 KDa); anidrase carbônica (29 KDa) e bacitracina (1,45 KDa) e o quociente do volume de eluição destas proteínas, pelo “void volume” (Ve/Vo) (FIORI-TUTIDA, 2003). A curva padrão de açúcares redutores (glicose) foi obtida pelo método de Lever (1972).

5.2.4 Determinação de enzimas relacionadas à defesa

Mesocótilos de sorgo obtidos conforme descrito por Meinerz et al. (2008) foram colocados em tubos para microcentrifuga (três mesocótilos/tubo) contendo 1,5 mL do decocto de avenca, ou dos seus precipitados obtidos por sulfato de amônio ou de cada fração protéica/glicídica obtida por CFG. Tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg mL⁻¹ do i.a.) (OSSWALD et al., 2004) foram utilizados como controles. Após 96 h de incubação à 25 °C e luz fluorescente, os folíolos foram amostrados e armazenados a -12 °C para posterior análise das enzimas relacionadas à defesa (STANGARLIN et al., 2000).

5.2.4.1 Obtenção da preparação enzimática

As amostras de folíolo de sorgo foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000g durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a 4 °C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

5.2.4.2 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases (POX) foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 2,9 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiacol 2% alcoólico e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,1 mL de preparação enzimática. A cubeta de referência continha 3 mL do substrato para enzima. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, pelo período de 2 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 15 seg, iniciando-se logo após a adição da preparação enzimática ao substrato. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorbância (abs). min⁻¹ mg proteína⁻¹.

5.2.4.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade das polifenoloxidases (PPO) 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 com 0,1101 g dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), formando uma solução de

catecol 0,02 M. A reação se desenvolveu misturando-se 900 μL de substrato e 100 μL da preparação enzimática. 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. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. min^{-1} mg proteína⁻¹.

5.2.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL da preparação enzimática foram acrescidos de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40 °C durante 2 h. Ao final desse período adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se de leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato protéico e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorbância a 290 nm e x a concentração de ác. *trans*-cinâmico (μg)) e expressa em mg de ácido *trans*-cinâmico h^{-1} mg proteína⁻¹.

5.2.4.5 Atividade de quitinases

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

espectrofotômetro a 550 nm. O controle consistiu de 800 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 200 μL de CM-Chitin-RBV (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade de quitinase foi determinada pela diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e a do controle, assumindo-se o valor de uma unidade de enzima para cada unidade de incremento na absorbância, sendo expressa em unidades de enzima $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

5.2.4.6 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 μL de preparação enzimática e 200 μL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL etanol; 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 250 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência consistiu de 800 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μL de reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína ($y = 0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)).

4.2.5 Análise dos resultados

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e aplicado teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) quando pertinente. O programa utilizado para análise estatística foi o software livre Sisvar (Versão 5.0).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Indução de enzimas relacionadas à defesa por precipitados com sulfato de amônio obtidos a partir de *A. capillus-veneris*

5.3.1.1 Atividade de peroxidase

Os valores da atividade de peroxidase para o decocto e seus precipitados com sulfato de amônio podem ser observados na Figura 5.1. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, embora os maiores valores observados para os precipitados 40-60% a 80-100% e ASM pudessem indicar um efeito supressor ou inibitório da atividade dessa enzima. Ao contrário do que aqui foi observado, outros trabalhos indicam a peroxidase como um bom marcador para se verificar o efeito de moléculas indutoras.

Iurkiv (2006), buscando avaliar o efeito da aplicação de extrato bruto de cúrcuma (1 e 10%) (*Curcuma longa*) e curcumina (50 e 100 mg L⁻¹) na atividade de peroxidase em tomateiro tratado aos 26 dias após o transplante e com amostragens às 24 h, 48 h, 96 h e 8 dias após a inoculação, obteve atividade de peroxidase nos diferentes tempos de amostragem, revelando incremento para os tratamentos com ASM e curcumina 100 mg L⁻¹ as 48 e 96 h após a inoculação na folha não tratada, indicando a capacidade de indução sistêmica de peroxidase.

Vigo-Schultz (2008) estudou a indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem, com tinturas vegetais de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Mikania glomerata* (guaco), *Equisentum* sp. (cavalinha) e *Hedera helix* (hera), e com os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomun zeylanicum* (canela). A autora verificou incremento na produção de peroxidase nas plantas pulverizadas com tinturas etanólicas de *L. alba*, *M. glomerata* e *Equisentum* sp., enquanto os óleos essenciais empregados não acarretaram aumento contrastantes em relação ao tratamento testemunha, quanto a produção de peroxidase.

Iurkiv (2008), buscando selecionar frações potencialmente eficientes no controle de ferrugem asiática, através de cromatografia de filtração em gel do extrato bruto aquoso de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, verificou que dois dos picos protéicos obtidos, os picos V (1,82 KDa) e o III (3,44KDa), incrementaram em 43% e 41% a atividade de peroxidase em relação ao extrato bruto ao qual eram provenientes.

Viecelli et al. (2009) avaliaram potencial do filtrado da cultura de *P. sanguineus* no controle da mancha angular do feijoeiro através da indução de resistência e verificaram que a atividade de peroxidase foi alterada em função do tratamento com filtrado de cultura na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando sistemicidade do efeito. O filtrado induziu atividade aos 4 dias após a inoculação, para a concentração de 10%, quando comparado com a água e fungicida, reduzindo posteriormente aos 5 e 7 dias após a inoculação. O filtrado a 20% inibiu parcialmente a atividade de peroxidase aos 5 e 7 dias após a inoculação em relação aos controles ASM e fungicidas, efeito semelhante foram observados na 4ª folha não tratada, indicando um provável efeito indutor sistêmico.

Di Piero (2003), buscando avaliar a atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas por cromatografia de troca aniônica de extrato aquoso de *L. edodes*, obteve elevação na atividade de peroxidases por dois picos obtidos (III e V), porém apenas o pico V (29 e 35 KDa) foi capaz de proteger plântulas de pepino contra antracnose.

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

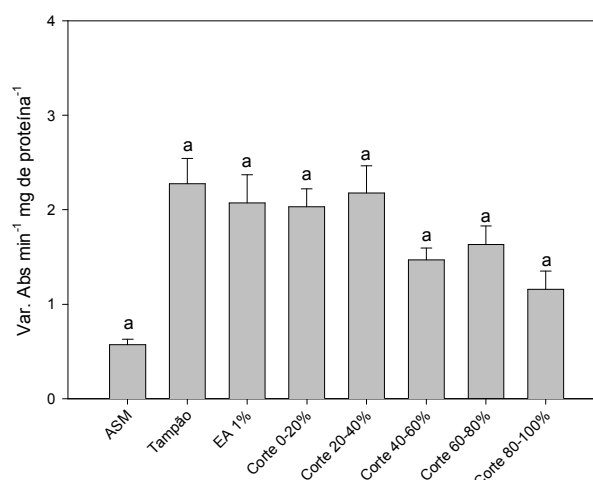


Figura 5.1. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônio. EA 1%: decocto de aveia 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.). CV%= 32,69.

5.3.1.2 Atividade de polifenoloxidasas

Para a atividade de polifenoloxidasas (Figura 5.2), não houve diferença significativa entre os tratamentos.

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

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

Iurkiv (2008), buscando avaliar a atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de soja tratados com frações precipitadas com sulfato de amônio, obtidas a partir do extrato do basidiocarpo *P. sanguineus*, verificou inibição de 53,5% na atividade desta enzima para a fração 0-20% em relação a testemunha água, indicando a provável presença de inibidores dessa enzima nesta fração.

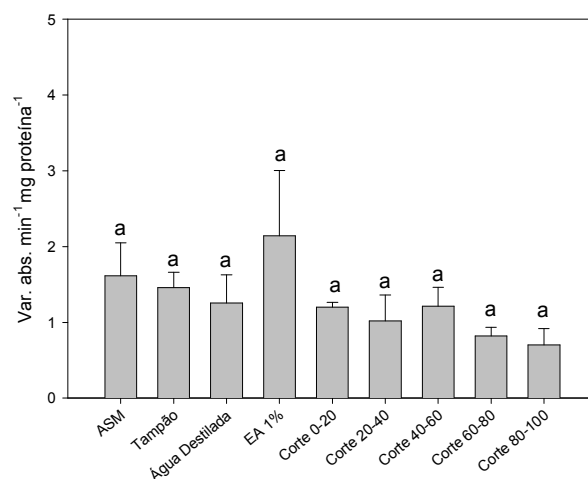


Figura 5.2. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônio. EA 1%: decocto de aveia 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). CV%= 37,56.

5.3.1.3 Atividade de fenilalanina amônia - liase

Para a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figura 5.3), apesar da ausência de diferença estatística entre os tratamentos, todas as frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio proporcionaram atividade de FAL menor que o

decocto não precipitado, atingindo até 48,8% de redução no corte 20-40, indicando possivelmente um efeito supressor dos cortes e/ou não recuperação de compostos eliciadores responsáveis pela atividade.

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 tratamentos avaliados no presente trabalho.

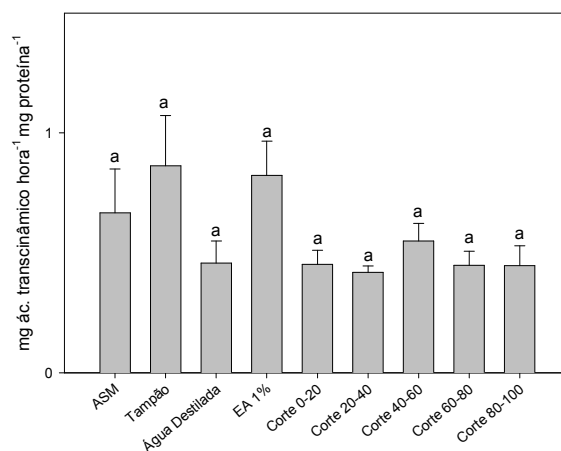


Figura 5.3. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônio. EA 1%: decocto de aveia 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). CV%= 29,89.

5.3.1.4 Atividade de quitinases

Para a atividade de quitinases (Figura 5.4) os maiores valores foram para a testemunha tampão fosfato de sódio e decocto (EA 1%) em relação a testemunha água destilada. Os precipitados com sulfato de amônio 0-20, 20-40, 60-80 e 80-100% foram inferiores ao tampão, decocto, água destilada, ASM e precipitado 40-60. ASM e

precipitado 40-80% tiveram o mesmo nível de indução. Na literatura não há relatos sobre a atividade de quitinase influenciada pelo tratamento com extratos de origem vegetal.

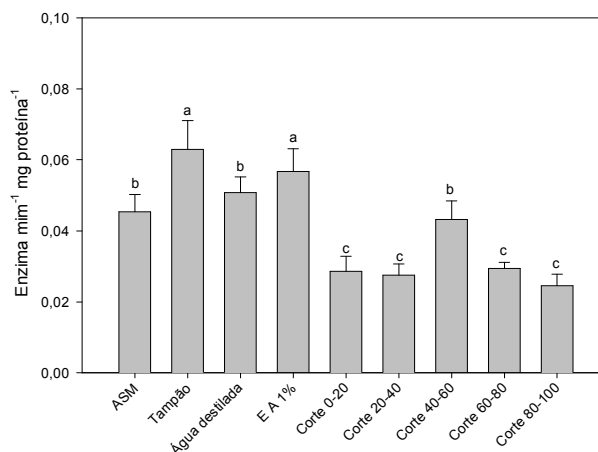


Figura 5.4. Efeito da aplicação de precipitados com sulfato de amônio obtidos de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) na atividade de quitinases em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônio. EA 1%: decocto de aveia 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). CV%= 32,49.

5.3.2 Indução de enzimas relacionadas à defesa por frações obtidas por cromatografia de filtração em gel a partir de *A. capillus-veneris*

5.3.2.1 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidase induzida pelo decocto de aveia (Figura 5.5 A) mostrou-se superior para os picos protéicos II, III e IV, embora serem diferentes da testemunha água destilada

Para as frações de CFG do precipitado 0-20% (Figura 5.5 B) o pico protéico II mostrou-se superior a todos os demais tratamentos, com incremento na atividade de peroxidase de até 39,2%. Para o precipitado com sulfato de amônio 20-40% e 40-60% não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5.5 C e D). Para o

precipitado 60-80% (Figura 5.5 E) as frações protéicas e de carboidrato reduziram a atividade em relação ao decocto e ao próprio precipitado não submetido à CFG. Para o precipitado com sulfato de amônio 80-100% (Figura 5.5 F) o fracionamento 80-100% e o pico II foram em média 89% superiores ao ASM na atividade de peroxidase.

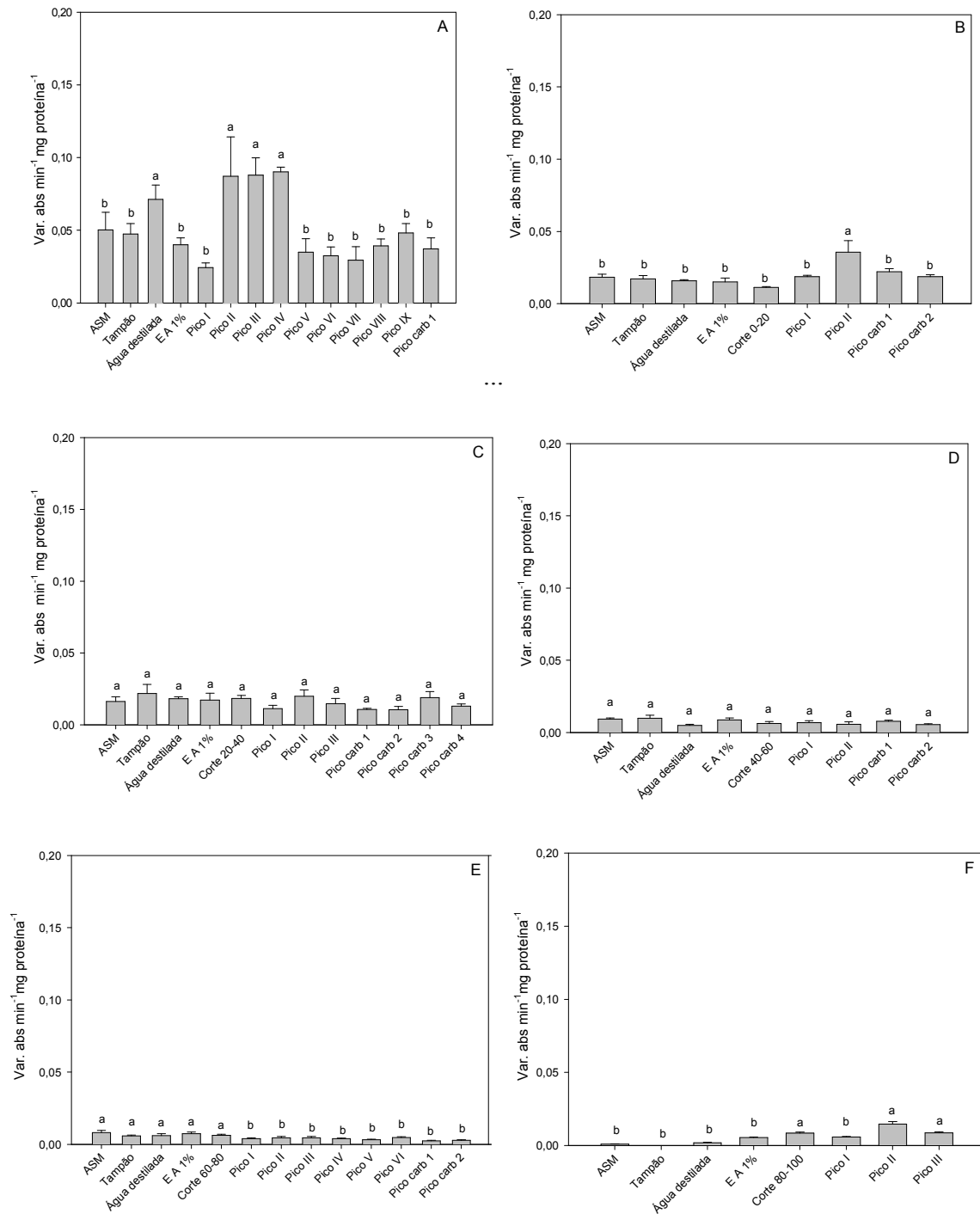


Figura 5.5. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de

amônio. EA 1%: decocto de avenca 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente. CV%= 36,04.

5.3.2.2 Atividade de polifenoloxidasas

Para a atividade de polifenoloxidase no decocto de avenca (Figura 5.6 A) foi observada diferença significativa para os picos proteícos VII, VIII e IX que não diferiram do padrão ASM. Para as frações CFG do precipitado com sulfato de amônio 0-20% (Figura 5.6 B), não houve diferença entre os tratamentos e as testemunhas negativas água e tampão. O mesmo foi observado para as frações dos precipitados 20-40% (Figura 5.6 C) e 40-60% (Figura 5.6 D). Para o precipitado 60-80% (Figura 5.6 E) todas as frações proporcionaram atividade menor ou igual aos controles negativos, e para o precipitado 80-100% (Figura 5.6 F) não houve diferença entre os tratamentos

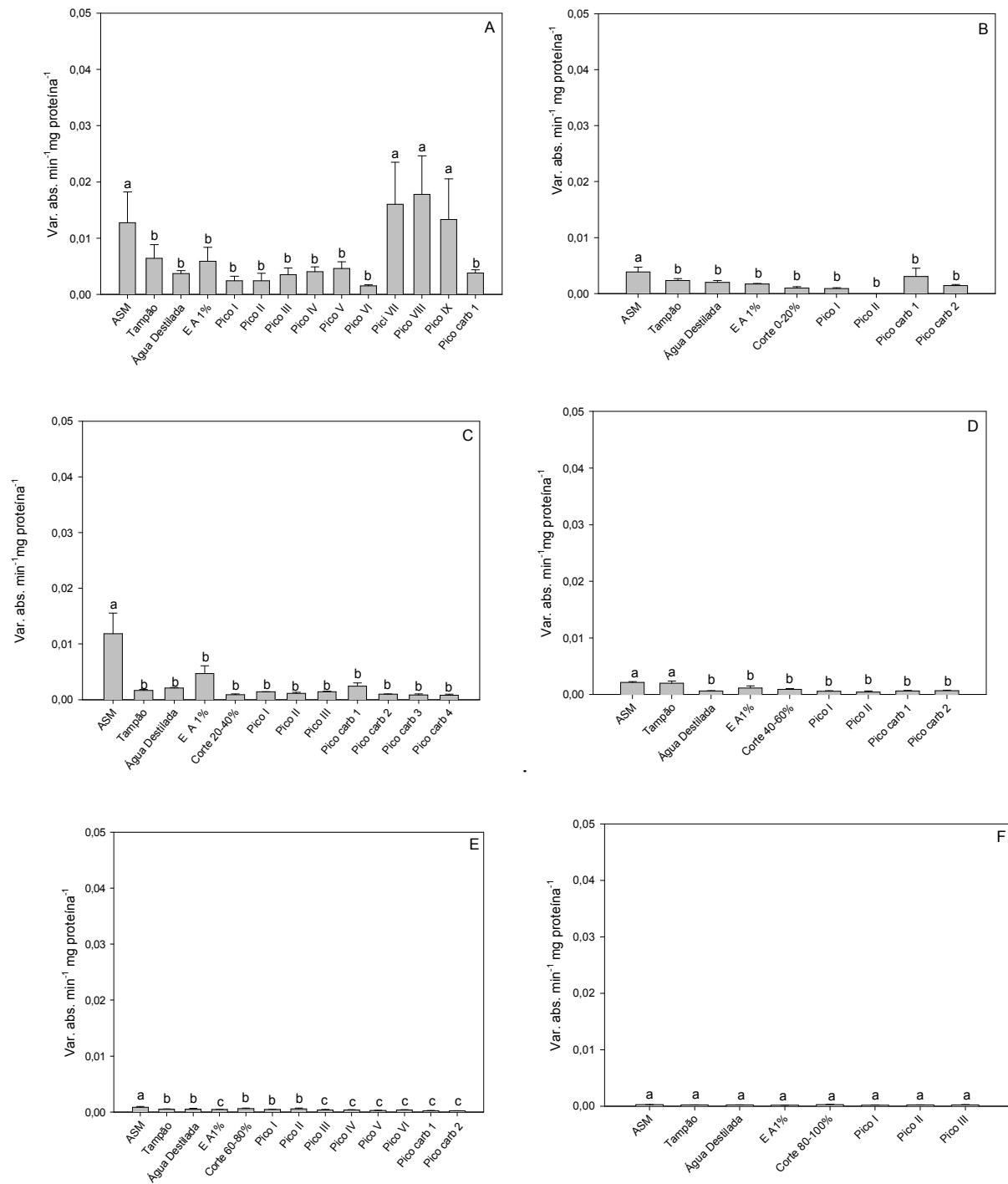


Figura 5.6. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de

amônio. EA 1%: decocto de avenca 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.). Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente. CV%= 39,25.

5.3.2.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase para as frações provenientes do decocto (Figura 5.7 A) mostrou-se superior para o tratamento pico protéico VIII não diferindo estatisticamente do pico glicídico 1, e dos picos protéicos I, II, V, IX. Os picos protéicos III e IV suprimiram a atividade enzimática, embora sem diferença nos tratamentos controle. Para as frações do precipitado com sulfato de amônio 0-20% (Figura 5.7 B) o pico protéico II foi superior aos demais tratamentos, sendo superior 90,7%, 87,3%, 70,2% e 33,4% ao decocto, ao próprio precipitado 0-20%, ao ASM e ao pico glicídico 2. A exemplo do que foi observado para a atividade de fenilalanina amônia-liase no decocto de avenca 1% (Figura 5.7 A), neste caso pode-se também supor uma possível presença de inibidores enzimáticos no EA 1% devido a baixa atividade para este tratamento.

Na Figura 5.7 C a atividade de fenilalanina amônia-liase para o precipitado com sulfato de amônio 20-40%, o decocto de avenca foi superior aos demais tratamentos, seguido pelos picos protéicos I e III. Para as frações do precipitado 40-60% (Figura 5.7 D), o decocto, o próprio precipitado sem fracionamento por CFG e o pico glicídico 2 induziram a atividade enzimática em relação aos tratamentos controle, o que também foi verificado para os picos protéicos II e V do precipitado 60-80% (Figura 5.7 E). Para as frações do precipitado 80-100% (Figura 5.7 F) não houve diferença entre os tratamentos.

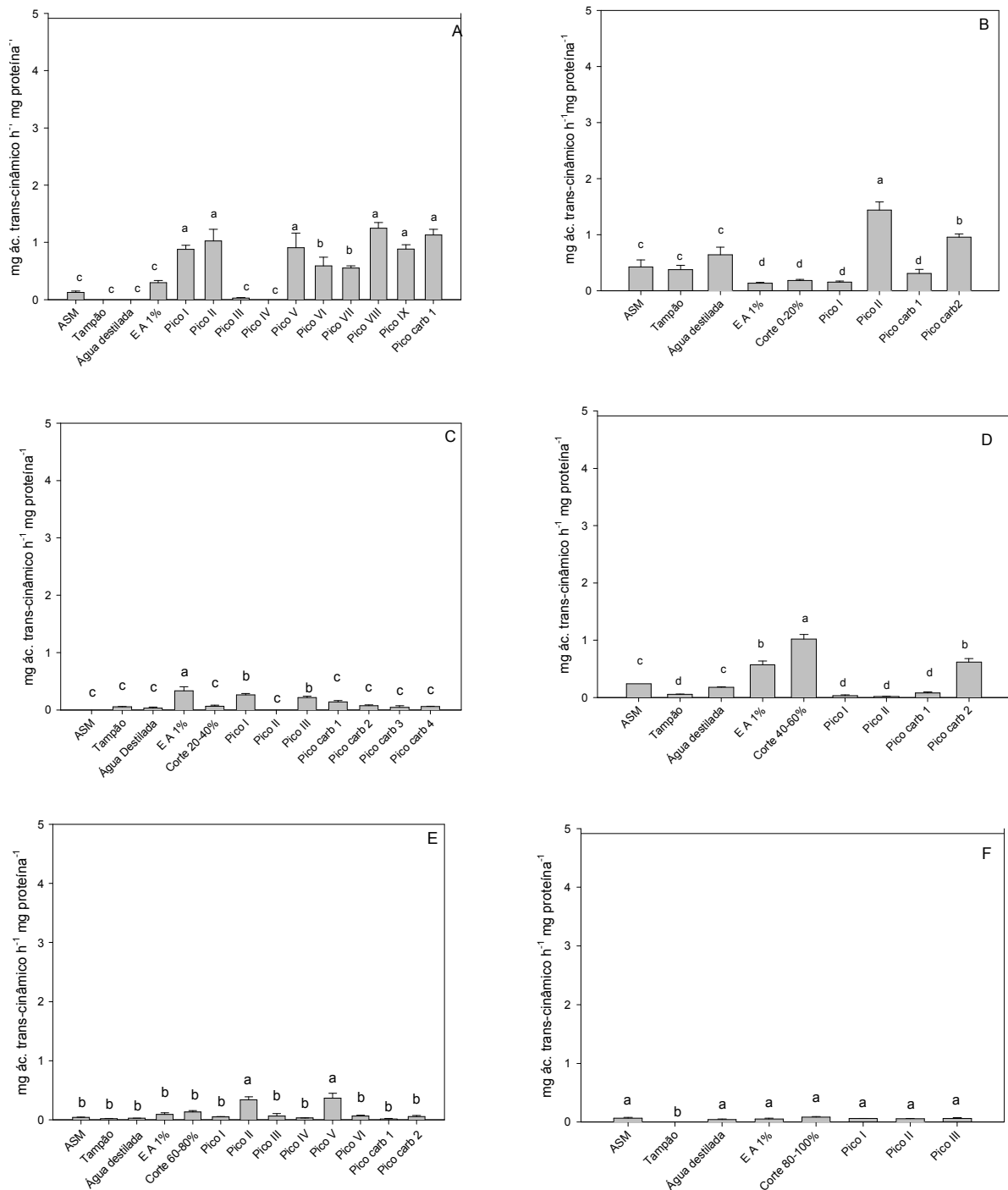


Figura 5.7. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de aveia (*Adiantum capillus-veneris*) 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com

sulfato de amônia. EA 1%: decocto de avenca 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM: acizenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.). Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente. CV%= 39,50.

5.3.2.4 Atividade de quitinase

Para a atividade de quitinase das frações do decocto de avenca (Figura 5.8 A) o pico protéico IV mostrou-se superior aos demais tratamentos, sendo superior 32,3%, 68,1% e 60,1% ao pico proteíco III, ASM e ao próprio decocto não precipitado, respectivamente. Para todos os precipitados (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100% de sulfato de amônio) e suas respectivas frações (Figura 5.8 B a F), todos os tratamentos foram iguais ou menores aos respectivos tratamentos controle negativos (água e tampão).

Diante dos resultados obtidos para os tratamentos envolvendo frações obtidas por CFG, é possível traçar um padrão de indução da atividade das enzimas estudadas, uma vez que o comportamento dos tratamentos padrões utilizados (água, tampão e ASM) foi muito variável, dentro de cada ensaio enzimático estudado.

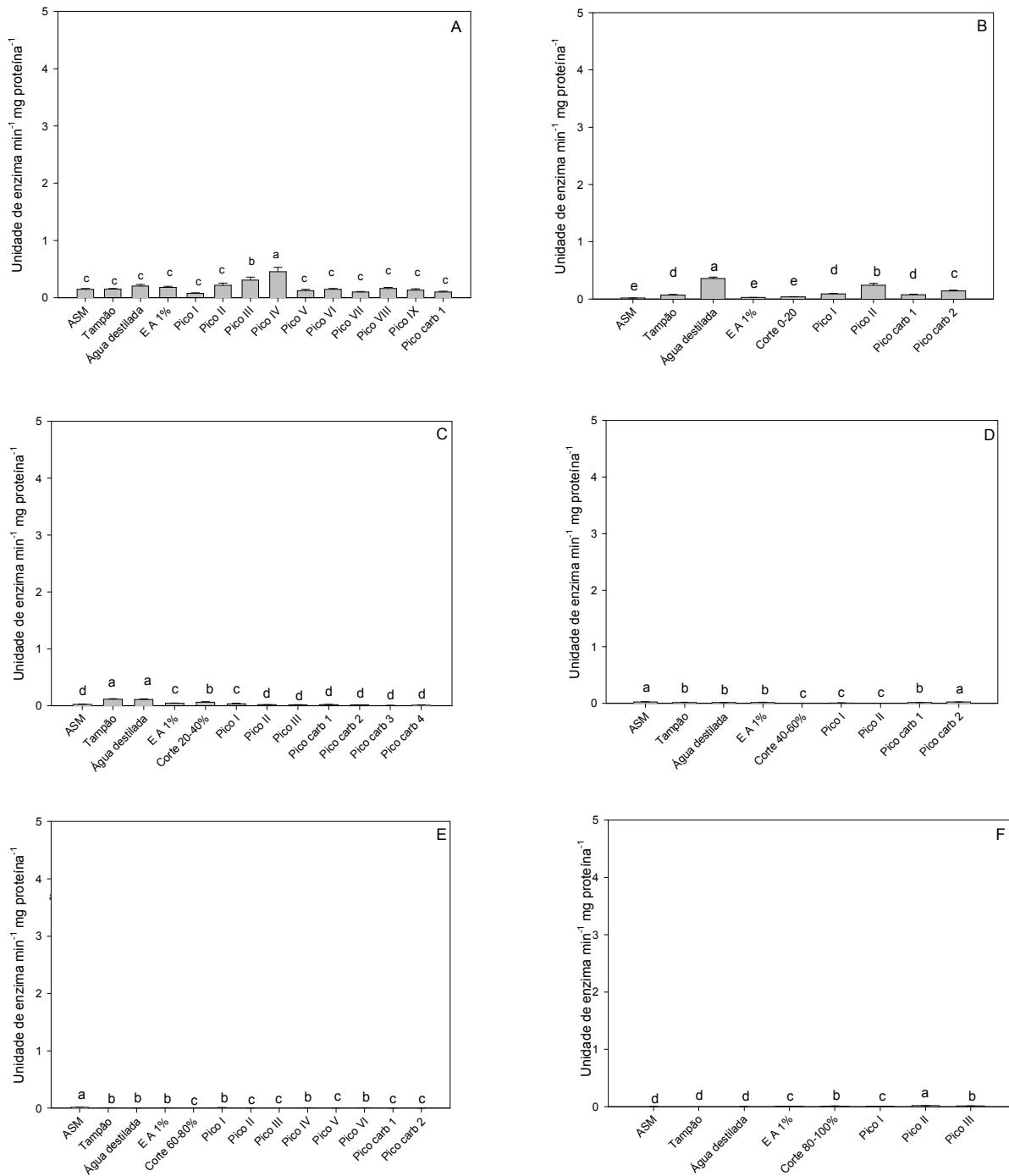


Figura 5.8. Efeito da aplicação de frações parcialmente purificadas de decocto de *Adiantum capillus-veneris* 1% (A) e de seus precipitados com sulfato de amônio em saturação de 0-20% (B), 20-40% (C), 40-60% (D), 60-80% (E) e 80-100% (F), obtidos por cromatografia de filtração em gel na atividade de quitinase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott ($P \leq 0,05$). Cortes 0-20 até 80-100 representam precipitados protéicos obtidos com diferentes saturações com sulfato de amônia. EA 1%: decocto de aveia 1%. Tampão: fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). ASM:

acizenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). Os picos referentes às frações protéicas e glicídicas encontram-se numerados sequencialmente com números romanos e arábicos, respectivamente. CV%= 35,87.

5.4 CONCLUSÃO

Foi possível, através da precipitação com sulfato de amônio isolar frações eliciadores a partir de decocto de *Adiantum capillus-veneris*, capazes de induzir atividade da enzimas relacionadas à defesa quitinase em sorgo.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

CARVALHO, J. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; CRUZ, M. E. S.; CARLOS, M. M. STANGARLIN, J. R. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citritus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 1, p. 88-93, 2008.

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, 263p. 2005.

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

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

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

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

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

FORMIGHIERI, A. P.; MEINERZ, C. C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillus-veneris* (L.) no controle de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, (Suplemento), p. 67, 2007.

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

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

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. **Atividade de peroxidase em plantas de tomaterio tratadas com extrato de *Curcuma longa* e Curcumina e infectadas com *Alternaria solani***. Marechal Cândido Rondon – PR. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2006.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Marechal Cândido Rondon PR. UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2008.

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

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

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

MEINERZ, C. C.; FORMIGHIERI, A. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; DIETERICH, C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Botucatu, v. 10, n. 2, p. 26-31. 2008.

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

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

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

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

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, 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.; ROMERO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piraciaca: FEALQ,. p.125-138. 2005.

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

PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. Efeito de aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 223-230, 2009.

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

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

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

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 265-304. 2008.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Ed. Herbarium Laboratório Botânico, 317p. 1997.

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

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**. v. 34, n. 2 p. 87-96. 2009.

VIGO-SCHULTZ, S. C. **Avaliação da indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijão vagem**. Botucatu – SP. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia). UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2008.

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

APÊNDICE

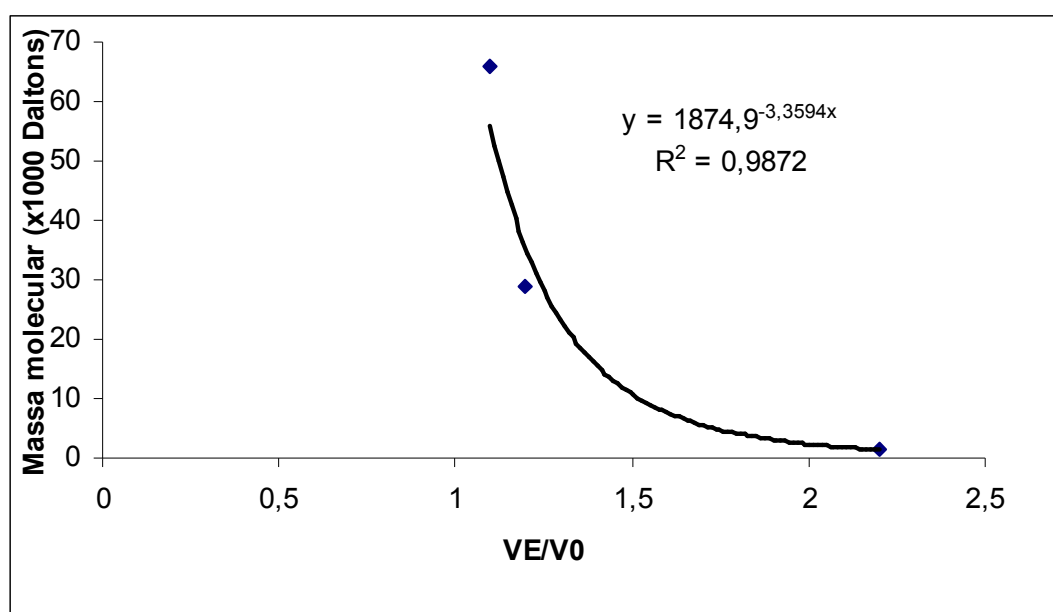


Figura 1. Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,0 cm x 30,0 cm) de Sephacryl S-100-HR (Sigma). Padrões moleculares: albumina de soro bovino (66 KDa); anidrase carbônica (29 KDa) e bacitracina (1,45 KDa). O volume vazio da coluna (V_0) foi determinado com azul de dextrana, na concentração de 2 mg mL^{-1} . Amostras de 1 mL eluídas em Tampão Fosfato de sódio 0,01M, pH 6,0. Frações coletadas de 2 mL, a fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

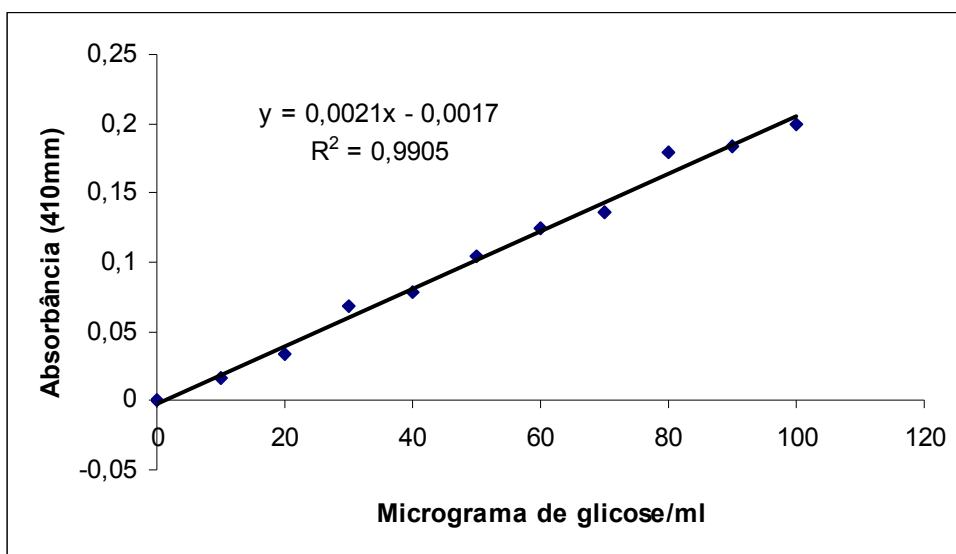


Figura 2. Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever.