

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

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E DE CRESCIMENTO DE SORGO
(*Sorghum bicolor* L.) TRATADO COM EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO**

CRISTIANE CLAUDIA MEINERZ

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PARANÁ – BRASIL

2013

CRISTIANE CLAUDIA MEINERZ

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E DE CRESCIMENTO DE SORGO
(*Sorghum bicolor* L.) TRATADO COM EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Luiz Portz

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
2013

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, Criador e mantenedor da vida.

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

Aos meus grandes amigos Omari Dildey, Laline Broetto, Heloísa Maria Formentini, Sidiane Coltro, Sidnei Francisco Müller, Deise Dalazen Castagnara, Luciana Iurkiv, Gilmar Franzener, Jeferson Klein, Artur Soares Pinto Junior, Adriano Mitio Inagaki, Edilaine Della Valentina, Emanuele Dal'Maso, Nicanor Pilarski, Vanessa Mattiello, Tatiane Modolon, Vanessa Vaz, Rogério Lopes Estevez, Marta Bianchini, Luiz Neri Berté, Eder Mezzalira, André Piva, Anderson Santin, as quais estiveram constantemente presentes e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, pela grande amizade, trabalhos realizados em conjunto e onde estiveram presentes no desenvolvimento deste trabalho e me apoiaram para a realização do mesmo.

Às amigas Luciana Cleci de Oliveira, Elisângela Loss, Juliane Mendes Lemos Viviane Ruppenthal, Bruna Rissato, Eloisa Lorenzetti, Marlon Hahn, Maria Cristina Copello Rottili, Andreia Cristina Peres Rodrigues da Costa e todos os meus colegas de pós-graduação pela amizade e companheirismo, estando sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos, tristes ou felizes.

Agradeço as pessoas que me deram apoio nos momentos difíceis dessa jornada, sempre me dando força, carinho e atenção.

Aos Professores Dr. Vandeir Francisco Guimarães, Dr^a Márcia de Moraes Echer, Dr^a. Marinélva Curti e Dr. Gilberto Braga.

A todos os professores, funcionários e vigias da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho, e contudo, colocaram um singelo e carinhoso apelido “patrimônio da Universidade”.

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

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.

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 avaliar aspectos bioquímicos, fisiológico e de crescimento de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) tratado com extratos de *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Pycnopus sanguineus*. Foram avaliados a indução de fitoalexinas deoxiantocianidinas, enzimas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3 glucanase e quitinase, metabolismo de carbono (fotossíntese e respiração) e crescimento de plantas de sorgo. Mesocótilos de sorgo foram tratados com os extratos vegetais e fúngico, além de acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg L⁻¹ do i.a. como elicitador de referência) e água destilada. Plântulas de sorgo foram tratadas com os indutores e às 24, 48, 96 e 144 horas foram retiradas amostras para as análises das enzimas de defesa. As avaliações de trocas gasosas foram realizadas periodicamente no período de 7 dias, com três dias de intervalo da aplicação dos tratamentos via foliar. Foram determinados: taxas de assimilação líquida de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eficiência do uso de água (EUA, $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e eficiência intrínseca do uso de água (EIUA, $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para análise de crescimento, realizada 120 dias após a semeadura, os parâmetros avaliados foram: massa fresca das folhas e raízes; massa seca das folhas e raízes e volume de raiz. Os parâmetros avaliados na análise de produção foram: número de panícula, número de sementes; massa média de grão e produção total. Os indutores bióticos alecrim, cúrcuma e *Pycnopus sanguineus* induziram fitoalexinas em mesocótilos e atividades bioquímicas nas diferentes cultivares de sorgo, podendo ressaltar que os resultados revelam um importante alvo de ação de elicitores presentes nesses extratos. De forma geral, o extrato de alecrim causou incremento na atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase; o extrato de cúrcuma induziu a atividade de fenilalanina amônia-liase e o extrato de *P. sanguineus* as

atividades de polifenoloxidase e β -1,3 glucanase. O indutor ASM interferiu no metabolismo da cultivar BRS 610 de sorgo em relação à eficiência do uso da água (EUA) e eficiência intrínseca do uso da água (EIUA), sem interferir na produtividade, melhorando a qualidade da produção e melhorando acentuadamente o número de panícula, massa de panículas, número de grãos e massa de grãos. Os extratos vegetais e fúngico não interferiram nesses parâmetros. Foi possível induzir mecanismos de defesa em sorgo pela aplicação dos extratos de alecrim, cúrcuma e *P. sanguineus*, 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, proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas, metabolismo de carbono.

ABSTRACT

Induced resistance involves the activation of latent defense mechanisms existing in plants in response to treatment with biotic or abiotic agents. The use of plant extracts in order to induce resistance mechanisms is an attractive alternative to chemical control, however, these extracts may occur the presence of inducer, as well as the presence of suppressor. This study aimed to evaluate biochemical, physiological and growth of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) treated with extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* and *Pycnopus sanguineus*. It was evaluated the induction of phytoalexins deoxiantocianidinas, peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, β -1,3 glucanase and chitinase, carbon metabolism (photosynthesis and respiration) and growth of sorghum plants. Mesocotyls sorghum were treated with the fungal and plant extracts, and acibenzolar-S-methyl (ASM) (125 mg L⁻¹ elicitor would like reference) and distilled water. Sorghum seedlings were treated with the inducers and at 24, 48, 96 and 144 hours samples were taken for analyzes of defense enzymes. Evaluations of gas exchange were conducted periodically over 7 days with three days interval of application of foliar treatments. Were determined rate of net CO₂ assimilation (A, CO₂ mol m⁻²s⁻¹), stomatal conductance (gs mmol H₂O m⁻²s⁻¹), sweating (E, H₂O mmol m⁻²s⁻¹) efficiency Water use (U.S. mol m⁻²s⁻¹) and intrinsic efficiency of the use of water (EIUA, mol m⁻²s⁻¹). For growth analysis, carried out 120 days after sowing, the parameters evaluated were: fresh leaves and roots, dry weight of leaves and roots and root volume. The parameters for production analysis were the number of panicle, seed number, mean grain mass and total production. Biotic inducers rosemary, turmeric and *Pycnopus sanguineus* induced phytoalexins in mesocotyls and biochemical activities in different cultivars of sorghum, may note that the results reveal an important target for the action of elicitors in these extracts. Overall, rosemary extract caused increase in peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase activities, the turmeric extract induced phenylalanine ammonia-lyase activity and the extract of *P. sanguineus* polyphenol oxidase and β -1,3 glucanase activities. ASM interfere with the metabolism of BRS 610 sorghum in relation to the efficiency of water use (U.S.) and intrinsic efficiency of water use (EIUA), without interfering with productivity,

improving the quality of production and improving markedly the number of panicle, panicle, grain number and grain weight. The fungal and plant extracts did not affect these parameters. It was possible to induce defense mechanisms in sorghum by application of extracts of rosemary, turmeric and *P. sanguineus*, which may allow the obtention of new molecules, and the development of alternative methods for controlling plant diseases.

Keywords: induction of resistance, pathogenesis-related proteins, phytoalexins, carbon metabolism.

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

M514	<p>Meinerz, Cristiane Claudia</p> <p>Aspectos bioquímicos, fisiológico e de Crescimento de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) tratados com extratos vegetais e fúngico / Cristiane Claudia Meinerz. - Marechal Cândido Rondon, 2013.</p> <p>105 p.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin</p> <p>Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2011.</p> <p>1. Sorgo. 2. Indução de resistência. 3. Proteínas relacionadas à patogênese. 4. Fitoalexinas. 5. Deoxiantocianidinas. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 633.174 CIP-NBR 12899</p>
------	--

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% (A)= 44,35; CV%(B)= 26,64%; CV%(C)= 29,55%; CV%(D)= 31,25%; CV%(E)= 22,96% e CV%(F)= 34,99%. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).55
- Figura 2 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 34,55. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).58
- Figura 3 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 28,96. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).61
- Figura 4 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.). ..64

Figura 5 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de β -1,3 glucanase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.). 66

Figura 6 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de quitinase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.). 68

Figura 7 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (●), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (○) e *Pycnopus sanguineus* 20% (▲), controle água destilada (■) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (□) em plântulas de sorgo da cultivar Brandes, na atividade de peroxidase (A), polifenoloxidase (B), fenilalanina amônia-liase (C), β -1,3 glucanase (D) e quitinase (E). Barras representam o desvio padrão. * Indica diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV%(A) = 23,65; CV%(B)=16,59; CV%(C)=31,56; CV%(D)=17,55 e CV%(E)=20,11. 71

Figura 8 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 32,42 e DMS= 13,60; CV% 2º dia =23,13 e DMS= 8,30; CV% 3º dia =23,73 e DMS= 9,26; CV% 4º dia =25,05 e DMS= 8,58 e CV% 5º dia = 55,44 e DMS= 21,88. F: 2,06. 75

Figura 9 - Condutância estomática (*gs*) em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 35,77 e DMS= 0,07; CV% 2º dia =26,38 e DMS= 0,05; CV% 3º dia =26,38 e DMS= 0,04; CV% 4º dia =36,85 e DMS= 0,05 e CV% 5º dia = 28,75 e DMS= 0,06. F: 3,18.....76

Figura 10 - Eficiência da taxa de transpiração da folha (*E*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 31,52 e DMS= 1,46; CV% 2º dia 24,64 e DMS= 1,05; CV% 3º dia =21,93 e DMS= 0,75; CV% 4º dia =30,11 e DMS= 1,06 e CV% 5º dia = 22,18 e DMS= 1,02. F: 3,54.77

Figura 11 - Eficiência do uso de água (*EUA*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 19,33 e DMS= 3,41; CV% 2º dia =7,58 e DMS= 0,05; CV% 3º dia =7,58 e DMS= 51,57; CV% 4º dia =11,75 e DMS= 2,31 e CV% 5º dia = 9,71 e DMS= 1,80. F: 2,94.....78

Figura 12 - Eficiência intrínseca do uso de água (*EIUA*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 21,84 e DMS= 24,68; CV% 2º dia =8,86 e DMS= 37,36; CV% 3º dia =8,86 e DMS= 47,26; CV% 4º dia =30,11 e DMS= 1,06 e CV% 5º dia = 13,92 e DMS= 61,43. F: 3,42.79

Figura 13 - Taxa de respiração (*R*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 46,79 e DMS= 1,07; CV% 2º dia =13,18 e DMS= 0,72; CV% 3º dia =22,61 e DMS= 0,29; CV% 4º dia =11,79 e DMS= 0,59 e CV% 5º dia = 56,84 e DMS= 1,46.F: 2,48.....80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Massa fresca e seca de parte aérea, massa de panícula e massa seca de raiz em função dos tratamentos com extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees 1080, aplicados semanalmente ao longo do ciclo da cultura. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).....83
- Tabela 2 - Número de grãos, massa de grãos, número de panículas e volume de raiz em função dos tratamentos com extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees 1080, aplicados semanalmente ao longo do ciclo da cultura. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).....84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A CULTURA DO SORGO	20
2.2 CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	21
2.2.1 Controle alternativo de doenças.....	22
2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	23
2.4 CUSTO ADAPTATIVO DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	25
2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS	26
2.6 FITOALEXINAS.....	28
2.7 PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA	31
2.7.1 Peroxidases (EC 1.11.1.7)	31
2.7.2 Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)	32
2.7.3 Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).....	33
2.7.4 Quitinases (EC 3.2.1.14)	33
2.7.5 β -1,3 glucanases (E C 3.2.1.39).....	34
2.7.6 Proteínas	35
2.8 TROCAS GASOSAS	35
2.9 POTENCIAL DE PLANTAS E FUNGOS MEDICINAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS	37
2.9.1 Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	39
2.9.2 Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	40
2.9.3 <i>Pycnopus sanguineus</i> (L. ex Fr.) Murr	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> E <i>Curcuma longa</i>	44
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Pycnopus sanguineus</i>	45
3.3 BIOENSAIO PARA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILO DE SORGO.....	45
3.4 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA	46
3.4.1 Obtenção da preparação enzimática.....	46
3.4.2 Atividade de peroxidases	47
3.4.3 Atividade de polifenoloxidase	47

3.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase	48
3.4.5 Atividade de quitinases.....	48
3.4.6 Atividade de β -1,3 glucanase	49
3.4.7 Determinação de proteínas totais.....	49
3.5 ENSAIO EM VASOS	50
3.5.1 Respiração e fotossíntese	50
3.5.2 Parâmetros produtivos	51
3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO	52
4.2 INDUÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM MESOCÓTILOS DE SORGO PELOS EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICOS	56
4.2.1 Atividade de peroxidase	56
4.2.2 Atividade de polifenoloxidase	59
4.2.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase	62
4.2.4 Atividade de β -1,3 glucanase	65
4.2.5 Atividade de quitinase	67
4.3 INDUÇÃO DE ENZIMA DE DEFESA EM PLÂNTULAS DE SORGO DA CULTIVAR BRANDES POR EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO	69
4.4 TROCAS GASOSAS	72
4.5 PRODUTIVIDADE E PARÂMETROS DE PRODUÇÃO	81
5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86

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 (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 latentes, 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).

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. Uma fonte para as moléculas elicitoras envolvidas nessa indução são as plantas medicinais.

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). Da mesma forma, extratos obtidos de fungos tem indicado o seu potencial para o controle de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2012; STANGARLIN et al., 2011).

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a indução de resistência em diferentes cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), a produção de fitoalexinas e de proteínas de defesa vegetal, aspectos fisiológicos, trocas gasosas e parâmetro de crescimento e produção pelos extratos aquosos das plantas

medicinais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cúrcuma (*Curcuma longa*) e do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO SORGO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é um cereal de grande importância no mundo, sendo o quinto colocado em área plantada, superado apenas pelo trigo, arroz, cevada e milho. É uma planta herbácea, da família das gramíneas, que possui espículas hermafroditas, misturadas com masculinas em uma panícula terminal, sendo as glumas das espículas ovóides, tridenteadas na ponta. As espécies são, geralmente, gramíneas anuais, raras vezes perenes, têm colmos altos e espessos, cheios de uma seiva doce. As folhas lineares são compridas e largas, semelhante às do milho (SCHIMIDT, 1998).

O sorgo tem como centro de origem a África e parte da Ásia. Apesar de ser uma cultura muito antiga, somente a partir do século XIX é que seu cultivo teve grande desenvolvimento em muitas regiões agrícolas do mundo. Nos países em desenvolvimento, o sorgo, principalmente o granífero, destina-se a alimentação humana, enquanto que em países desenvolvidos é utilizado como alimento animal (SILVA et al., 2007).

O sorgo é cultivado em áreas e situações ambientais muito secas e/ou muito quentes, onde a produtividade de outros cereais é antieconômica. Embora de origem tropical, o sorgo vem sendo cultivado em latitudes de até 45° norte ou 45° sul, e isso só foi possível graças aos trabalhos dos melhoristas de plantas, que desenvolveram cultivares com adaptação fora da zona tropical. Esta planta é cultivada principalmente onde a precipitação pluvial anual se situa entre 375 e 625 mm ou onde esteja disponível irrigação suplementar (MAGALHÃES et al., 2000).

Entre as espécies alimentares, o sorgo é uma das mais versáteis e mais eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação. Sua reconhecida versatilidade se estende desde o uso de seus grãos como alimento humano e animal; como matéria prima para produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas; o uso de suas panículas para produção de vassouras; extração de açúcar de seus colmos; até às inúmeras aplicações de sua forragem na nutrição de ruminantes (PINTO, 2001).

Agronomicamente os sorgos são classificados em quatro grupos: granífero; forrageiro para silagem e/ou sacarino; forrageiro para pastejo/corte verde/fenação/cobertura morta e vassoura. O primeiro grupo inclui tipos de porte baixo (híbridos e variedades) adaptados à colheita mecânica. O segundo grupo inclui tipos de porte alto (híbridos e variedades) apropriados para confecção de silagem e/ou produção de açúcar e álcool. O terceiro grupo inclui tipos utilizados principalmente para pastejo, corte verde, fenação e cobertura morta (variedades de capim sudão ou híbridos inter específicos de *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*). O quarto grupo inclui tipos de cujas panículas são confeccionadas vassouras. Dos quatro grupos, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica e está entre os cinco cereais mais cultivados em todo o mundo, ficando atrás do arroz, trigo, milho e cevada (ALVAREZ et al., 1999).

A cultura do sorgo, no Brasil, mostra-se suscetível a um grande número de doenças, muitas das quais podem ser limitantes à sua produção, dependendo das condições ambientais e da suscetibilidade da cultivar. Dependendo do ano e da região onde o sorgo é cultivado, pode ocorrer o ataque de patógenos causadores de doenças foliares e da panícula, de agentes causais de doenças sistêmicas, além de fungos de solo causadores de podridões radiculares e viroses. Dentre as doenças que afetam a cultura do sorgo no Brasil, podem ser citadas como mais importantes as seguintes: antracnose (*Colletotrichum graminicola*), míldio (*Peronosclerospora sorghi*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), ferrugem (*Puccinia purpurea*), ergot (*Claviceps africana*), também conhecida como doença açucarada do sorgo, e a podridão seca (*Macrophomina phaseolina*) (PANIZZI et al., 2005).

2.2 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 (SOBRINHO et al., 2005).

Para o controle de doenças tem sido empregado basicamente o uso de fungicidas em função de ser método prático, eficiente e 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).

2.2.1 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 obtidos de plantas medicinais e de microrganismos (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., 2005a; 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).

2.3 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). 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., 2005a), 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).

2.4 CUSTO ADAPTATIVO DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

O uso de indutores nem sempre resulta na produção de benefícios, pois com a ativação da resistência há demanda elevada de energia na planta para a síntese dos mecanismos de defesa vegetal (SILVA et al., 2003).

O custo fisiológico de resistência é o efeito negativo resultante da expressão da resistência sob determinadas condições em que a resistência não é necessária, como a ausência de um patógeno (HEIL; BOSTOCK, 2002; DIETRICH et al., 2005). Se a energia é alocada para a proteção onde não há condições para a ocorrência de doenças, o investimento pode não valer a pena e o custo ser muito maior do que simplesmente o valor de aplicação de um indutor (KUHN, 2007).

O processo de indução de resistência gera custos para a planta e a alocação de recursos da planta para o crescimento ou defesas é determinado pela

competição por substrato comum e energia, sendo que a planta deve balancear os investimentos nesses processos (GAYLER et al., 2004).

A resistência induzida em condições naturais representará custo apenas na presença do patógeno, alocando recursos para este propósito somente quando necessários (BOSTOCK, 2005).

Gayler et al. (2004) propôs um modelo usado para demonstrar o balanço energético na planta, onde assimilados são disponibilizados através da fotossíntese, e utilizados para o crescimento produzindo biomassa estrutural. Parte dos assimilados é carregada para gerar defesas constitutivas e o excedente é conduzido para tecidos de reserva. Quando a planta necessitar, estes fotoassimilados são carregados para a defesa induzível e se a disponibilidade dos mesmos for baixa, pode ocorrer a inversão por parte das reservas, e estas, voltam a ser disponíveis.

Alem do custo energético, existe o custo metabólico, que é explicado pela repressão de alguns genes (KUHN; PASCHOLATI, 2007). Esta repressão pode ocorrer para balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro do sistema planta, como efeito compensatório (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998), dando menor importância a uma atividade que no momento se tornou secundária (LOGEMANN et al., 1995).

2.5 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 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 se mostram 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 alguns microrganismos fitopatogênicos (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., 2005b).

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

2.6 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, 2004b).

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. As fitoalexinas já 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., 2005a).

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).

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 tratamento controle.

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 autoclavado dessa planta o tratamento em sorgo na concentração de 40% do extrato obtido por infusão e decocção, promoveu indução de 45 e 34 vezes, respectivamente, na síntese de fitoalexinas, e a concentração de 20% de extrato obtido por 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.

2.7 PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA

2.7.1 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., 2005b). A enzima peroxidase e suas isoformas apresentam várias funções na defesa vegetal celular, pela sua participação na hipersensibilidade, lignificação, suberização, 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, 2004b). 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-as 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., 2005b).

2.7.2 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, 1979). 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, 1979).

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., 1988). Na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por fermento, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência, as PFO são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos (CONSTABEL; 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, 2005). 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

polifenoloxidasas e peroxidases lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (CAMPOS et al., 2003).

2.7.3 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 a mesma cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004b). 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).

2.7.4 Quitinases (EC 3.2.1.14)

As quitinases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilgucosamina). 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.

2.7.5 β -1,3 glucanases (E C 3.2.1.39)

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

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

2.7.6 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 indutor de resistência.

2.8 TROCAS GASOSAS

As determinações de variáveis ecofisiológicas são muito importantes, não somente na compreensão do comportamento vegetativo das plantas, mas sobretudo no seu desempenho pontual em relação as respostas aos tratamentos impostos (NOGUEIRA; SILVA-JUNIOR, 2001).

O crescimento das plantas está condicionado primordialmente à obtenção de energia proveniente da radiação solar, através da interceptação e utilização no processo de fotossíntese. A fotossíntese líquida do dossel reflete na produção de biomassa, a qual poderá ser influenciada por fatores como: luz, temperatura, umidade, fertilidade do solo, e também pelo manejo adotado (intensidade e frequência de corte ou pastejo), sendo, portanto, importantes condicionadores da arquitetura do dossel (LOPES et al., 2013).

De acordo com Floss (2004), cerca de 90% da produção biológica das plantas ocorre em resposta à atividade fotossintética. O aumento na resistência difusiva estomática pode ocasionar diminuição na fotossíntese líquida (AMARAL et al., 2006). Assim, a verificação das trocas gasosas constitui-se em importante ferramenta na determinação de adaptação e estabilidade de plantas a determinados ecossistemas, isto porque a redução no crescimento (e a consequente diminuição na produtividade) das plantas pode estar relacionada à redução na atividade fotossintética, limitada por fatores abióticos intrínsecos ao local de cultivo (PEIXOTO et al., 2002; PAIVA et al., 2005).

Desta forma, a quantificação das trocas gasosas realizadas nas folhas compreendendo assimilação líquida de CO₂, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂ na câmara subestômática, eficiência do uso de água, entre outros está intimamente relacionada ao estado hídrico do vegetal, bem como seu desenvolvimento (NOGUEIRA et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004a). Além disso, a qualidade e a intensidade da luz são fatores ambientais que podem influenciar nas trocas gasosas ocorridas nas plantas (COSTA; MARENCO, 2007).

Dentre os fatores físicos do ambiente, a luz desempenha papel relevante na regulação da produção primária, contribuindo de forma efetiva para o crescimento das plantas (DOUSSEAU et al., 2007). Porém, a resposta ou a sensibilidade das sementes à luz é específica para cada espécie (FERRAZ-GRANDE; TAKAKI, 2006). Para Bevenuti; Machia (1997) e Silveira et al. (2004) a luz atua de maneira bastante complexa e variável. A percepção dos sinais luminosos é realizada por receptores, principalmente pelo fitocromo (KENDRICK; KRONENBERG, 1994; SMITH, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004a). Os fitocromos são holoproteínas que contêm o cromóforo fitocromobilina, pigmentos azuis que podem ser encontrados em cinco formas (A, B, C, D e E) codificadas por cinco genes distintos e podem ser encontrados em duas formas interconversíveis: fitocromo vermelho (Fv) e fitocromo vermelho-extremo (Fve) (WHITELAM; DEVLIN, 1997; FERRAZ-GRANDE; TAKAKI, 2006). A forma de Fv transforma-se em Fve quando absorve luz vermelha no comprimento de onda em torno de 660 nm, enquanto que a forma Fve transforma-se em Fv quando absorve luz no comprimento de onda em torno de 730 nm (TAIZ; ZEIGER, 2004a).

É válido mencionar que as respostas morfofisiológicas dos vegetais não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da qualidade espectral (MARTINS et al., 2008). Nesse sentido, a faixa compreendida

entre 400 e 480 nm representa a luz azul, que possui importante papel fisiológico no desenvolvimento das plantas em aspectos como abertura estomática, alongamento do caule e direcionamento do crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2004a). Segundo Kinoshita et al. (2001) a adição de luz azul leva ao aumento considerável na abertura estomática. Conforme Srivastava; Zeiger (1995) a abertura estomática segue a radiação fotossinteticamente ativa na superfície da folha, onde a maior abertura estomática está diretamente relacionada à maior taxa de luminosidade (TAIZ; ZEIGER, 2004a).

2.9 POTENCIAL DE PLANTAS E FUNGOS 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) que tanto podem ter ação antimicrobiana direta (BENETT; WALLSGROVE, 1994), quanto ação eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (STANGARLIN et al., 2008). 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 pode contribuir para a aquisição de novas técnicas de controle de doenças de plantas (BONALDO et al., 2004).

Na literatura é possível encontrar muitos 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 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).

Formighieiri 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 euvitis* 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*, pelo extrato obtido por maceração e 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, enquanto que para *B. subtilis* não houve inibição.

Bonaldo et al. (2007a), 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, e verificou 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-folhas (*Achillea millefolium*) e poejo (*Mentha pulegium*), verificaram que estes extratos promoviam a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja.

2.9.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Planta semi arbustiva, perene, lenhosa, ramificada, da família Lamiaceae, cuja altura oscila entre 50 cm a 2 m, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* Lineu), possui folhas de comprimento de 2 a 4 cm e largura de 1 a 4 mm, sendo lineares, estreitas, opostas, sésseis, coriáceas, com bordos recurvados ou enrolados para dentro ao longo da nervura central. A página superior das folhas é verde rugosa, e a página inferior com pêlos finos é brilhante e esbranquiçada. As flores estão dispostas em pequenos cachos na axila de brácteas e possuem cor azul-violeta, rosada ou branca (HERTWIG, 1986; SILVA e SANT'ANA, 1995; CORRÊA et al., 1998).

Rosmarinus officinalis é originária do Mediterrâneo, sendo vulgarmente conhecida como alecrim, alecrim-de-jardim, rosmarim, rosmarinho, rosmarino,

libanotis, alecrim de cheiro e alecrim de horta. Possui os seguintes princípios ativos: taninos, flavanóides, óleo essencial rico em terpenos (cineol, pineno, borneol, canfeno, eucaliptol, acetato de isobornila, velarianato de isonila, cânfora), além de saponinas, ácidos (cítrico, glicólico, glicínico, rosmarínico), nicotinamida, colina, pectina, rosmaricina e vitamina C (HERTWIG, 1986; CORRÊA et al., 1998; MARTINS et al., 2000).

O óleo essencial obtido das folhas é constituído principalmente de timol (50 – 60%) e carvacrol (5 – 8%), acompanhado de *p*-cimeno (12 – 27%), *cis*-cariofileno (1 – 10%), γ -terpineno (6%), mirceno (2%) e outros terpenos em menores quantidades. O timol é antimicrobiano, destacando-se sua atividade contra espécies de *Penicillium*. O carvacrol é antifúngico e anti-helmíntico usado na veterinária (TESKE; TRENTINI, 1997).

No controle de doenças em plantas, o alecrim é relatado por Röder et al. (2007), no controle da podridão causada por *Colletotrichum* sp. em frutos de morango e por Itako et al. (2008) pela eficiência na redução da severidade de cladosporiose (*Cladosporium fulvum*) em folhas de tomateiro. Trabalho com extrato de alecrim autoclavado e não autoclavado na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, mostrou que a maior inibição do fungo (18,6%) foi com extrato autoclavado, e que a autoclavagem não teve efeito sobre a indução de faseolina (BRAND et al., 2010). Testes *in vitro* com óleo essencial de alecrim também se mostram promissores no controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, responsável pelo crestamento bacteriano comum em feijão vagem cultivar Bragança (VIGO-SCHULTZ, 2008) e *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha em plantas de pimentão (MARTINS et al., 2010).

2.9.2 Cúrcuma (*Curcuma longa* L.)

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta originária da Índia e pertencente a família Zingiberaceae. Apesar de pouco cultivada no Brasil é, todavia, muito comum em quase todos os estados como planta subespontânea sendo tradicionalmente usada na culinária, medicina, em farmácia e como corante, entre outros usos (CORRÊA, 1984). Existem vários dados na literatura indicando uma grande variedade de atividades farmacológicas desta planta, a qual exibe atividade anti-inflamatória (LORENZI; MATOS, 2002; ARAÚJO; LEON, 2001), inibição do vírus

da imunodeficiência humana, antibacteriana, efeitos antioxidantes (BALASUBRAMANYAN et al., 2003), atividades contra protozoários (ARAÚJO et al., 1999), atividade nematicida (ARAÚJO; LEON, 2001), bactericidas (UECHI et al., 2000), e antifúngica (APISARIYAKUL, VANITTANAKOM; BUDDHASUKH, 1995). Outros trabalhos também relatam que a cúrcuma promove benefícios como a inibição do vírus da imunodeficiência humana Tipo-1 (MAZUMDER et al., 1995), além de possuir atividade antitumorígena (SURH, 2002), anticarcinogênica (LIN; LIN-SHIAU, 2001) e atividade antimutagênica (ARAÚJO; LEON, 2001).

Dentre os constituintes fixos do óleo essencial de cúrcuma, os principais são os curcuminóides, dos quais a curcumina, de coloração amarela, é a principal (LORENZI; MATOS, 2002), sendo responsável por diversas de suas ações biológicas (ARAÚJO; LEON, 2001). O rizoma de cúrcuma é rico em compostos como turmerona, α e β -pineno, canfeno, limoneno, terpineno, cariofileno, linalol, borneol e cineol (RIBEIRO; DINIZ, 2008), e compostos fenólicos como os curcuminóides. Os curcuminóides estão quimicamente relacionados ao seu principal ingrediente, a curcumina. Três principais curcuminóides foram isolados da cúrcuma: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (BALASUBRAMANYAM et al., 2003).

A utilidade medicinal da cúrcuma despertou o interesse dos pesquisadores em utilizá-lo no controle de doenças em plantas. Rodrigues et al. (1999), avaliando o potencial de *Zingiber officinale* (gengibre) no controle de fungos fitopatogênicos, verificaram a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum graminicola*.

Outros trabalhos relatam a eficiência de extratos de cúrcuma no controle da mancha parda, crestamento foliar e oídio na soja, causados pelos fungos *Septoria glycines*, *Cercospora kikuchii* e *Microsphaera diffusa*, respectivamente (BECKER et al., 2004). Em alface cultivado organicamente, o tratamento com massa de gengibre resultou em aumento da atividade da enzima peroxidase e redução na incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*, além de reduzir o crescimento micelial e a produção e germinação de escleródios do fungo (RODRIGUES, 2004). Na cultura do tomate citam-se resultados positivos para pinta preta (*Alternaria solani*) (BALBI-PEÑA et al., 2006) e murcha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) (STANGARLIN & KUHN, 2009). Na cultura da mandioca, relata-se para murcha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (KUHN et al., 2006) e em arroz para

mancha folicular bacteriana (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) (JABEEN et al., 2011).

2.9.3 *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr

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

Esta espécie apresenta uma frutificação semicircular e de consistência lenhosa, que se forma horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-laranja (LEPP, 2008). Cresce naturalmente em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (NOBLES; FREW, 1962). Além disso, a presença de compostos como ligninase, Mn-peroxidase e β -glucosidade, indica-o como potencial para uso industrial.

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

Ainda que a diversidade dos Basidiomicotas em ecossistemas tropicais seja vasta (HAWKSWORTH, 1991), no Brasil existem poucas pesquisas relacionadas com a utilização de basidiocarpos (cogumelos e orelhas de pau) para o controle de doenças em plantas, demonstrando a escassez de estudos relacionados ao potencial dos mesmos para ativação de mecanismos de defesas em vegetais (STANGARLIN et al., 2011 e 2012). As espécies de cogumelos mais facilmente reconhecidas como os comestíveis (ISHIKAWA, KASUYA e VANETTI, 2001; PACCOLA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002) ou medicinais (SMÂNIA et al., 1995a), são alvo da maioria das investigações.

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

Peiter-Beninca et al. (2008), trabalhando com indução de fitoalexinas e atividade de peroxidase em sorgo e soja tratados com extrato de Basidiocarpos em três soluções orgânicas de *P. sanguineus* (hexânica, etanólica e diclorometânica), em diferentes concentrações, verificaram que extrato hexânico (750 mg L⁻¹) e etanólico (100 mg L⁻¹) tiveram atividade elicitora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Os resultados promissores das pesquisas obtidos com extratos de *P. sanguineus* indicam um grande potencial deste fungo no controle de doenças em plantas (VIECELLI et al., 2009; 2010).

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

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

Toillier et al. (2010) verificaram que extrato aquoso de micélio de *P. sanguineus* estimulou o crescimento de *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*, enquanto extratos aquosos de basidiocarpo e de filtrado da cultura de *P. sanguineus* reduziram o crescimento da bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR. Neste trabalho foram utilizados extratos aquoso (EA) de alecrim 10%, cúrcuma 10% e *Pycnopus sanguineus* 20% em ensaios para indução de fitoalexinas em mesocótilos de seis variedades de sorgo, para ativação de enzimas de defesa em plantas e efeito dos tratamentos no metabolismo de carbono (fotossíntese e respiração) e crescimento vegetal.

3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Rosmarinus officinalis* E *Curcuma longa*

As plantas de alecrim e cúrcuma, provenientes do município de Marechal Cândido Rondon/PR, foram coletadas no horto de plantas medicinais da UNIOESTE, no período da manhã, entre maio a novembro de 2010. As folhas de alecrim foram secas por 5 dias em estufa de circulação forçada à temperatura de 40 °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; Trentini (1997). Os rizomas de cúrcuma foram coletados, lavados e congelados até o momento do uso para obtenção do extrato bruto. Os extratos aquosos foram obtidos nas seguintes proporções: para alecrim colocou-se 10 g do pó em 90 mL de água destilada fria, até a homogeneização do pó vegetal. Para cúrcuma, 10 g de rizoma congelado foram triturados por 5 minutos em rotação máxima em liquidificador com 90 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 5200 g, filtrada em papel de filtro Whatman nº1, e em seguida em microfiltrada com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro. As soluções extraídas foram denominadas de extrato bruto (EA) de alecrim 10% e cúrcuma 10%, onde os mesmos foram armazenados a 4 °C até o momento de uso, não ultrapassando 4 dias de armazenamento.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Pycnoporus sanguineus*

Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados de troncos em decomposição na primavera de 2010 em Marechal Cândido Rondon – PR, secos em estufa a 40 °C por 2 horas e moídos em moinho de faca. Para obtenção do extrato bruto foi utilizado pó seco de basidiocarpos de *P. sanguineus* hidratado por 24 horas a 4 °C em água destilada estéril, na proporção de 14 mL para cada grama de pó (DIPIERO, 2003). Após esse período a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1, e em seguida foi microfiltrada com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro. A solução extraída foi denominada extrato aquoso (EA) e armazenado a 4 °C até o momento de uso, não ultrapassando de 7 dias de armazenamento. Para os ensaios, esse EA foi diluído para 20% com água destilada.

3.3 BIOENSAIO PARA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILO DE SORGO

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], das cultivares Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees 1080, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% (15 min), lavadas em água destilada e embebidas em água a ± 25 °C 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 dos extratos brutos de alecrim 10%, cúrcuma 10% e *P. sanguineus* 20%. Como padrões utilizou-se água destilada 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 absorvância foi determinada a 480 nm em espectrofotômetro UV-VIS (NICHOLSON et al., 1988).

3.4 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 dos extratos brutos de alecrim 10%, cúrcuma 10% e *P. sanguineus* 20%. 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).

Este ensaio foi realizado de duas formas: inicialmente foi analisado o efeito dos três extratos na ativação de enzimas de defesa nos seis cultivares de sorgo com amostras coletadas 60 horas após a aplicação. Dos resultados deste ensaio e do ensaio de fitoalexinas, foi selecionada a melhor cultivar de sorgo para novo ensaio, utilizado agora plântulas de sorgo com 25 dias de idade cultivada em bandeja de poliestireno expandido contendo substrato para produção de mudas. Essas plântulas foram tratadas com os três indutores e às 24, 48, 96 e 144 horas foram retiradas amostras para as análises das enzimas de defesa.

3.4.1 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 20.000 g durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a 4 °C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

3.4.2 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 absorvância (abs). $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade das polifenoloxidases (PPO) foi determinada usando-se metodologia de Duangmal e 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 absorvância 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. $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.4 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 (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorbância a 290 nm e x a concentração de ác. *trans*-cinâmico (μg)) e expressa em mg de ácido *trans*-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.5 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 9500 g por 6 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. O controle consistiu de 800 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) 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 $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.6 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina conforme a metodologia de Vogelsang; Barz (1993). Para tanto, 150 μ L do extrato enzimático foram adicionados a 150 μ L de laminarina (2 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Como controle, utilizou-se a mesma reação onde a laminarina foi adicionada imediatamente antes da determinação de açúcares (sem incubação). A reação foi conduzida a 40 °C durante 60 min, em banho-maria. Após o período de incubação, os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972). Para isso, foi retirada uma alíquota de 50 μ L dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida a 100 °C por 10 min e resfriada em banho de gelo. A leitura das absorvâncias foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorvância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de 30 concentrações de glicose. Os valores foram expressos em equivalente mg de glicose h⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.4.7 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 μ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 μ L de preparação enzimática e 200 μ L de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL etanol; 125 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 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 μ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μ L de reagente. A absorvância foi plotada em curva padrão para proteína ($y = 0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorvância a 595 nm e x a concentração de proteína (μ g)).

3.5 ENSAIO EM VASOS

Sementes de sorgo das cultivares Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agroceres 1080 foram semeadas em vasos com capacidade para 8,0 L contendo mistura de solo + areia + esterco bovino curtido (2:1:2). Foram cultivadas duas plantas em cada vaso, estas mantidas em casa de vegetação, até o momento da inoculação, localizada no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Professor Dr. Mário César Lopes, da Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon/PR, localizada a 24°33'40" de latitude sul, 54°04'00" de longitude oeste, e altitude média de 400 m. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições.

Para os ensaios visando verificar o efeito de aplicações preventivas de indutores de resistência sobre o metabolismo de carbono (fotossíntese e respiração) e crescimento de plantas de sorgo, para novo ensaio, utilizando agora plântulas de sorgo com 25 dias de idade cultivada em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato para produção de mudas. Essas plântulas foram tratadas com os três indutores e às 24, 48, 96 e 144 horas foram retiradas amostras para as análises das enzimas de defesa. Foram realizados os tratamentos: a) testemunha ou controle negativo: plantas tratadas com água destilada; b) controle positivo: indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM: 125 mg L⁻¹ do i.a.); c) extrato bruto de basidiocarpos de *P. sanguineus* (20%); d) extrato do bruto de alecrim (10%) e f) extrato aquoso de cúrcuma 10%. Os extratos foram aplicados a cada sete dias, totalizando nove aplicações. As aplicações eram feitas na forma de pulverização de toda a planta até o ponto de quase escorrimento foliar.

3.5.1 Respiração e fotossíntese

A respiração e fotossíntese foram avaliadas por métodos não destrutíveis, conforme utilizado por Ribeiro, Machado e Oliveira (2003), sendo que a medida de CO₂ e o fluxo de vapor d'água foram obtidos em folhas maduras e completamente expandidas, com o auxílio de um medidor portátil, sistema fechado, infravermelho de gás (IRGA), modelo LI-6400, da Li-Cor, Lincoln, NE, USA, sempre na região mediana do terceiro par de folhas novas e totalmente expostas à radiação solar. A condição ambiental para o aparelho foi a mesma na qual as plantas cresceram. A

assimilação de CO₂ foi medida pela manhã, entre 8 e 10 horas, sendo armazenada quando o coeficiente de variação do dado foi menor que 1%. A respiração foi medida pela noite, entre 21 e 23 horas com a fonte luminosa desligada sendo armazenado o valor de liberação de CO₂ quando o coeficiente de variação foi menor que 1%.

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas periodicamente no período de 7 dias, com três dias de intervalo da aplicação dos tratamentos via foliar. Foram determinados: taxas de assimilação líquida de CO₂ (**A**, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (**g_s**, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (**E**, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eficiência do uso de água (**EUA**, $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e eficiência intrínseca do uso de água (**EIUA**, $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) correspondeu à relação entre a quantidade de CO₂ assimilado por unidade de água perdida pela transpiração.

3.5.2 Parâmetros produtivos

A análise de produção foi realizada 120 dias após a semeadura, quando as plantas já estavam na fase de maturação e colheita. Os parâmetros avaliados nas análises de crescimento foram: massa fresca das folhas; massa fresca de raiz; massa seca das folhas; massa seca de raiz e volume de raiz. Os parâmetros avaliados na análise de produção foram: número de panícula, número de sementes; massa média de grão e produção total por tratamento.

3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados 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 Sisvar (Versão 5.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO

Os resultados de indução para a cultivar Brandes podem ser observados na Figura 4.1 (A) O extrato bruto de alecrim 10% foi semelhante ao indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM); o extrato de cúrcuma 10% foi semelhante a *P. sanguineus* 20%, e todos foram diferentes da testemunha água destilada. O extrato bruto de alecrim 10% promoveu um incremento de 875%, *P. sanguineus* 20% com 625% e cúrcuma 10% com 475% na quantidade de fitoalexina, em relação a testemunha água, indicando presença de atividade indutora.

A indução de fitoalexinas para as cultivares BR 304, BR 601, BRS 610 e Agroceres 1080 podem ser observados na Figura 4.1 (B, D, E e F). Os extratos de alecrim 10%, cúrcuma 10% e *P. sanguineus* 20% foram semelhantes as testemunhas água destilada e ASM.

Para a cultivar BRS 310, conforme demonstrado na Figura 4.1 (C), a testemunha água destilada promoveu indução de fitoalexina 86,91% superior em relação ao extrato cúrcuma 10%, 166% superior *P. sanguineus* 20% e 24,3% superior a alecrim 10%. Os extratos bruto foram semelhantes ao ASM.

Alguns trabalhos, com extratos vegetais, utilizados no entanto, na forma bruta, tem indicado o potencial indutor de fitoalexinas 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*) e orégano (*Origanum vulgare*), foram eficientes na indução de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em sorgo.

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-folhas (*Achillea millefolium*) e poejo (*Mentha pulegium*), verificaram que estes promoviam a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja.

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.

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.

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

Peiter-Beninca et al. (2008), trabalhando com indução de fitoalexinas e atividade de peroxidase em sorgo e soja tratados com extrato de basidiocarpos em três soluções orgânicas de *P. sanguineus* (hexânica, etanólica e diclorometânica) em diferentes concentrações, verificaram que extrato hexânico (750 mg L⁻¹) e etanólico (100 mg L⁻¹) tiveram atividade elicitora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Meinerz et al. (2008), verificando a atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris*), em formas diferentes de extratos, observaram que a síntese de fitoalexinas em sorgo foi de até 45, 34 e 40 vezes para os extratos autoclavados, e de 52, 69 e 38 vezes para os não autoclavados, considerando-se infusão, decocção e maceração, respectivamente, em relação ao controle. Para ASM o incremento foi de 58 vezes.

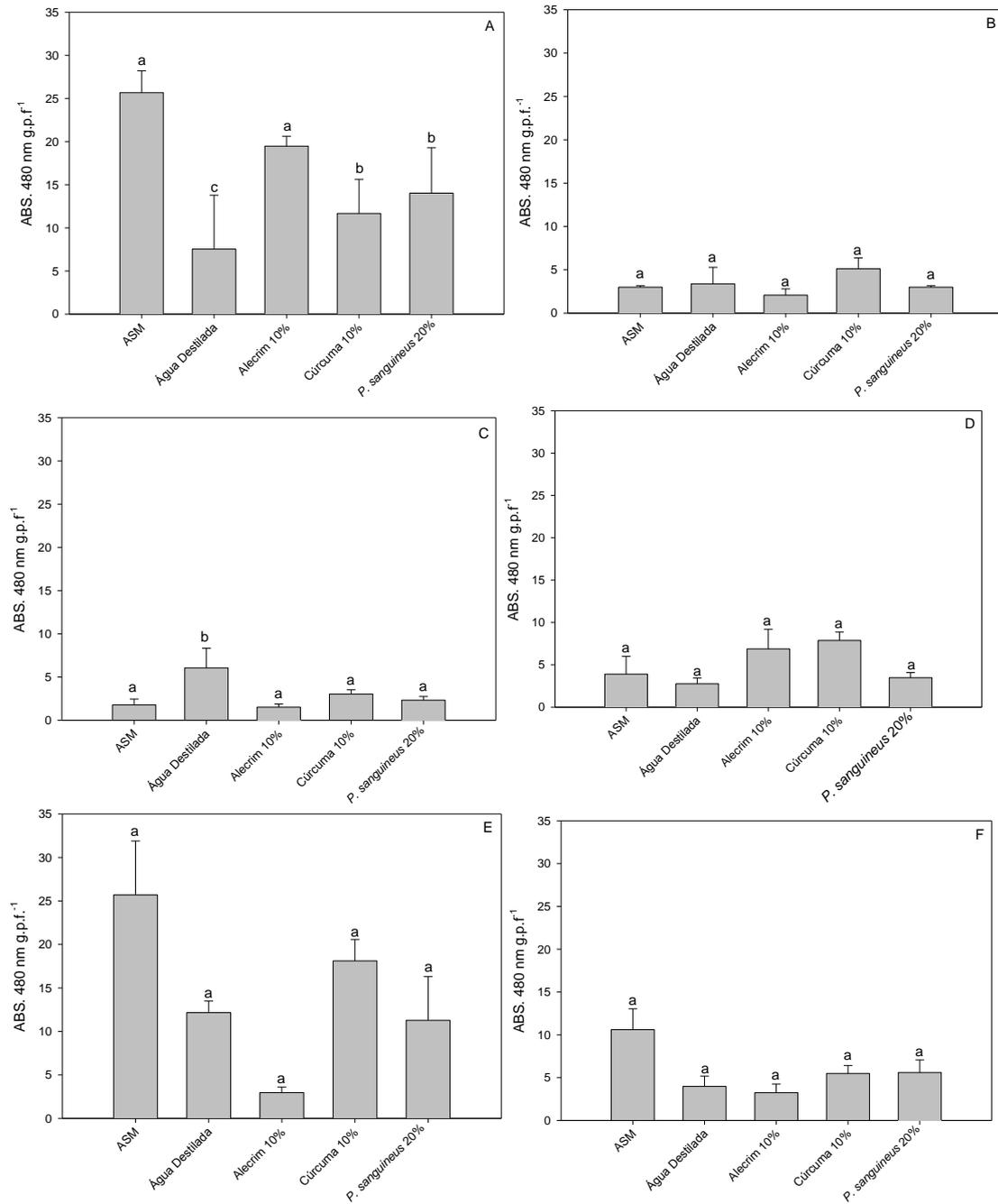


Figura 1 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV%(A)= 44,35; CV%(B)= 26,64%; CV%(C)= 29,55%; CV%(D)= 31,25%; CV%(E)= 22,96% e CV%(F)= 34,99%. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.).

4.2 INDUÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM MESOCÓTILOS DE SORGO PELOS EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICOS

4.2.1 Atividade de peroxidase

Com relação à atividade de peroxidase para a cultivar Brandes (Figura 2A), tanto ASM, água destilada e alecrim 10% promoveram significativo incremento na atividade dessa enzima. O indutor biótico alecrim foi superior na sua atividade elicitora com 86,7% e 75,3%, em relação às testemunhas água destilada e ASM. Para o genótipo BR 601 (Figura 2D) o *P. sanguineus* 20% foi semelhante à testemunha água destilada, diferindo somente do indutor ASM e dos extratos vegetais alecrim e cúrcuma, que causaram supressão na atividade de 30,1%, 32,4% e 33,3%, respectivamente. Para a cultivar BRS 610 (Figura 2E), somente para ASM foi significativo o incremento da atividade, os demais compostos biológicos não diferiram com relação à testemunha água destilada.

Para a cultivar BR 304, tanto ASM como alecrim 10% tiveram significativa indução na atividade da enzima que foi de 29,3% e 47,4% superior, respectivamente, em relação à testemunha água. Os extratos de cúrcuma e *P. sanguineus* mostraram-se semelhantes à testemunha água (Figura 2B).

Para as cultivares BRS 310 e Agroceres (Figuras 2C e 2F), os extratos vegetais e fúngico não promoveram significativa diferença entre os tratamentos na atividade de peroxidase.

Esses resultados revelam um importante alvo de ação de elicitores presentes nos extratos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), que foi o único extrato que diferiu significativamente da testemunha água.

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.

Meinerz et al. (2007), buscando avaliar o potencial indutor de peroxidases de extratos de *P. sanguineus* a 1, 5, 10, 15 e 20% em cotilédones de

soja, observaram que a atividade enzimática teve comportamento quadrático com maior valor observado na concentração 5%, onde ocorreu incremento de 41% em relação a testemunha água.

Peiter-Beninca et al. (2008), avaliando indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpo de *P. sanguineus*, observaram que os extratos diclorometânico para sorgo e soja inibiram a atividade da enzima.

Vigo-Schultz (2008) estudou a indução de resistência no controle do crestamento 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.

Lurkiv (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 o 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, e efeito semelhante foi observado na 4ª folha não tratada, indicando um provável efeito indutor sistêmico.

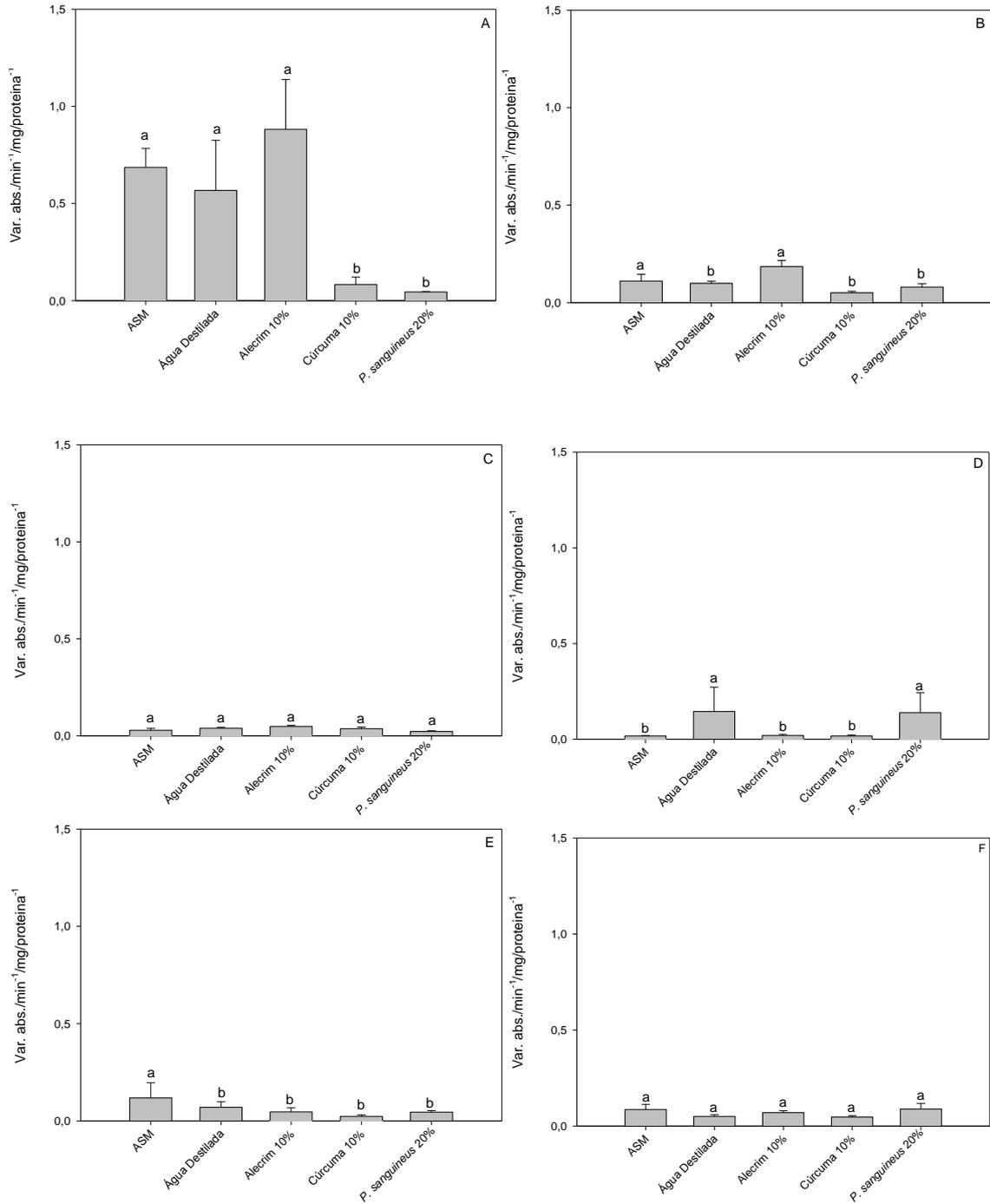


Figura 2 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de peroxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 34,55. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.).

4.2.2 Atividade de polifenoloxidase

Para a atividade de polifenoloxidase na cultivar Brandes (Figura 3A) apenas para o indutor ASM houve diferença estatística. Na Figura 3B para a cultivar BR 304 o extrato de alecrim promoveu incremento significativo na atividade dessa enzima, sendo 87,3% e 68,4% superior em relação às testemunhas água destilada e ASM, respectivamente. Os extratos de cúrcuma e *P. sanguineus* mostram-se semelhantes quando comparados a água destilada.

Quando apresentado a cultivar BRS 610 todos os compostos biológicos foram superiores à testemunha ASM, mas, no entanto, semelhante à água destilada (Figura 3E). Na Figura 3F para a cultivar Agrocerees, tanto ASM, alecrim e *P. sanguineus* promoveram atividade superior de 40,1%; 57,2% e 44,4%, em relação à testemunha água destilada, respectivamente. O extrato de cúrcuma mostrou-se semelhante à água destilada.

Para as cultivares BRS 310 e BR 601 (Figuras 3C e 3D), os extratos vegetais e fúngico não promoveram diferença significativa e incremento na atividade dessa enzima.

As polifenoloxidases são enzimas que geralmente se apresentam em concentração elevada em tecidos infectados, promovendo a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da lesão provocada pelo patógeno, resultando no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (AGRIOS, 2005). Campos et al. (2004) constataram que há correlação positiva entre as atividades da peroxidase e da polifenoloxidase, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose em plantas de feijão. Melo et al. (2006) observaram que a atividade das polifenoloxidases, juntamente com outros compostos fenólicos presentes na planta, está diretamente ligada com a resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem nas plantas de café.

Meinerz et al. (2007), avaliando o potencial indutor de polifenoloxidases 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 polifenoloxidases em plantas de feijão tratadas com extratos aquosos de *P. sanguineus*, não verificou incrementos significativos na atividade específica de polifenoloxidases, 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 polifenoloxidases 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.

Franzener (2011), estudando a caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*, verificou que apenas o ativador de plantas ASM promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima, que ocorreu tanto em cotilédones de pepino bem como em folhas de feijoeiro, porém, por outro lado, o resultado do extrato aquoso não diferiu estatisticamente do obtido pelo ASM e manifestou um sensível efeito sobre essa enzima ao apresentar efeito 88,4% superior ao apresentado pelo precipitado.

Formentini et al. (2011), avaliando atividades bioquímicas em sorgo induzidas por extratos vegetais de alecrim, cúrcuma e gengibre verificaram que para a enzima polifenoloxidase houve indução pelo tratamento com o extrato de cúrcuma 15%, o qual, no entanto, foi semelhante aos demais tratamentos e à testemunha ASM, sendo diferente somente para a água. Estes resultados indicam a ausência ou baixa atividade do potencial desses extratos vegetais para induzir resistência em sorgo a fitopatógenos.

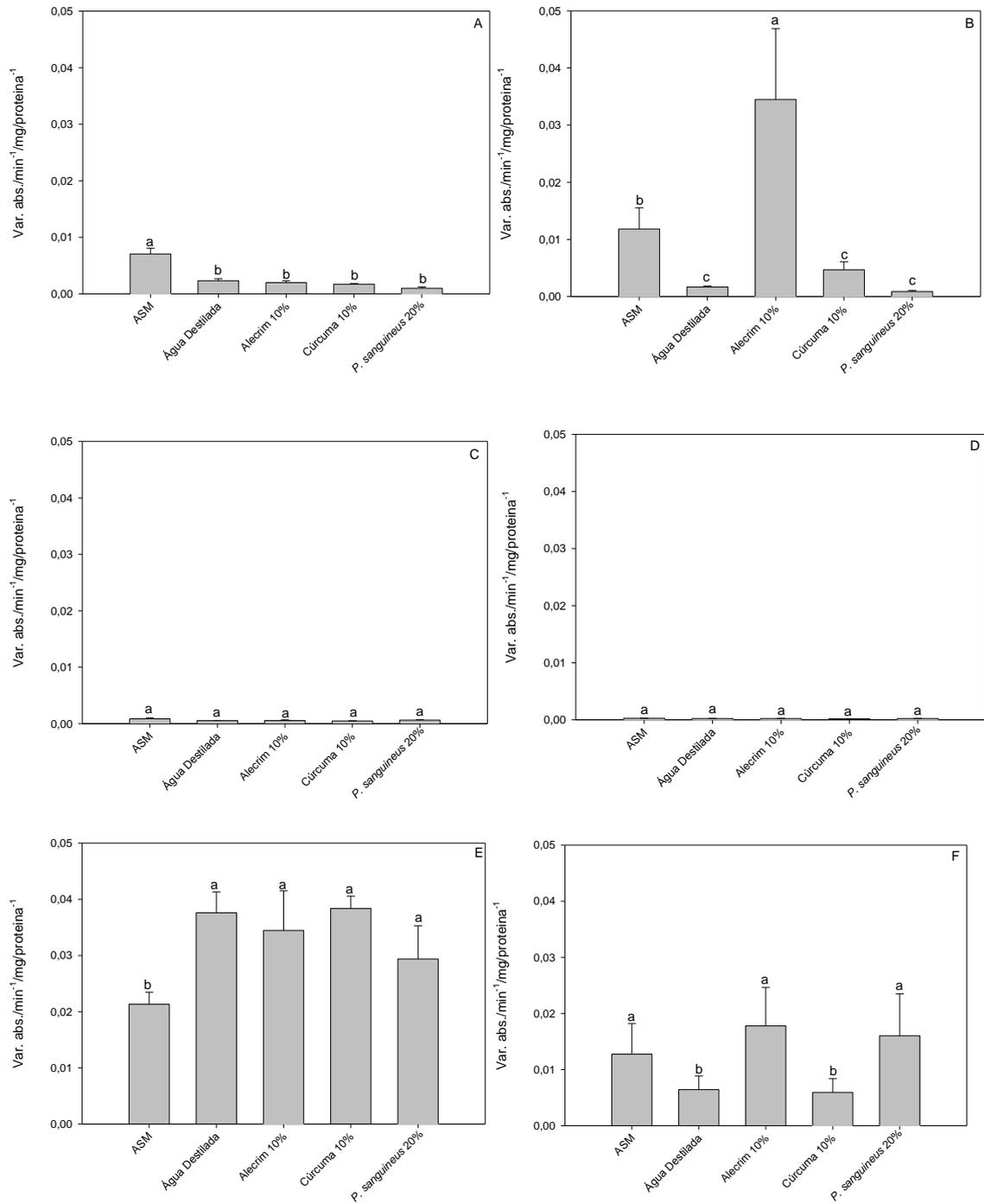


Figura 3 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de polifenoloxidase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 28,96. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.).

4.2.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase

Os resultados da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) estão apresentados nas Figuras 4A e 4C, onde se observa que nos folíolos de sorgo das cultivares Brandes e BRS 310 foi verificada alteração significativa na atividade dessa enzima em função dos extratos vegetais e fúngico. Para a cultivar Brandes (Figura 4A) o extrato de cúrcuma apresentou 29,4% e 17,6% de incremento na atividade em relação às testemunhas ASM e água destilada, respectivamente. Para o basidiocarpo *P. sanguineus* este foi 41,6% e 25% superior na atividade dessa enzima, quando comparados com as testemunhas ASM e água destilada.

Para a cultivar BRS 310 (Figura 4C) os resultados mostram-se semelhantes, porém, os extratos que obtiveram incrementos significativos em relação a esta atividade foram alecrim e cúrcuma, sendo 63,6% e 36,3% superiores quando comparados a água destilada e ASM.

Para a cultivar BR 304 (Figura 4B), ASM, água destilada e alecrim não diferenciaram entre si para a enzima FAL, enquanto os extratos de cúrcuma e *P. sanguineus* reduziram a atividade enzimática.

Para a cultivar BR 601 (Figura 4D) o indutor de referência ASM foi superior aos demais tratamentos enquanto alecrim não diferiu da água, e cúrcuma e *P. sanguineus* reduziram a atividade. Para as cultivares BRS 610 e Agroceres (Figuras 4E e 4F, os extratos vegetais e fúngico não promoveram significativos incrementos na atividade dessa enzima, não diferindo das testemunhas, e essas permanecendo semelhantes as mesmas.

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.

Meinerz (2010) trabalhando com indução de mecanismos bioquímicos de defesa vegetal em sorgo por frações obtidas do decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*) verificou que para a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL), 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.

Franzener (2011) relatou que os resultados da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de feijoeiro não apresentaram alteração significativa na atividade dessa enzima em função dos tratamentos, mas em cotilédones de pepino, ASM e extrato aquoso de eucalipto foram capazes de estimular a atividade dessa enzima em 16,2 e 18,5%, respectivamente.

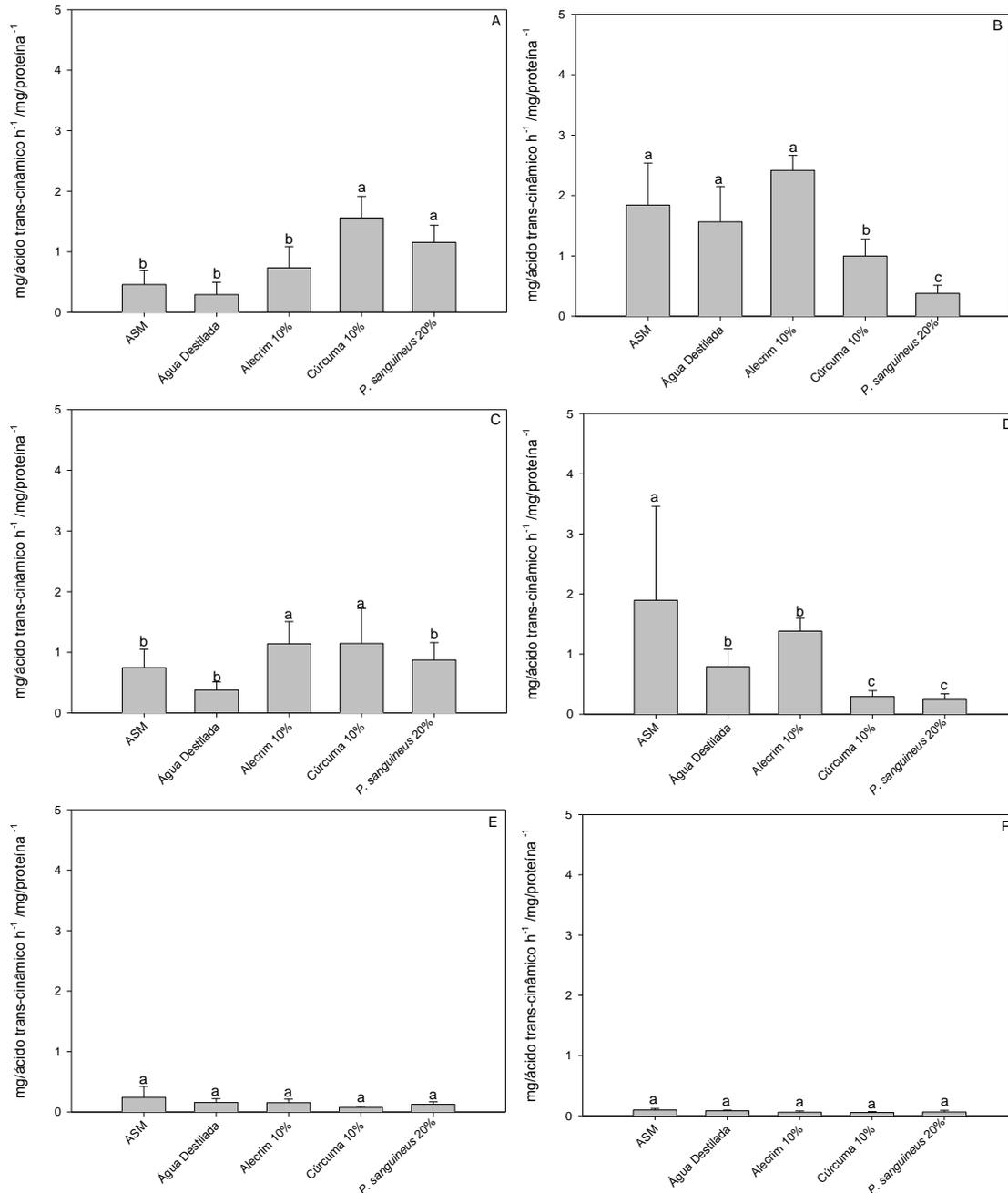


Figura 4 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de fenilalanina amônia-liase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.).

4.2.4 Atividade de β -1,3 glucanase

Com relação à β -1,3 glucanase na cultivar Brandes (Figura 5A), ASM não diferiu da água destilada e os extratos de alecrim, cúrcuma e *P. sanguineus*, reduziram a atividade desta enzima.

Para a cultivar BR 304 (Figura 5B) todos os tratamentos reduziram a atividade enzimática. Para a cultivar BR 601 (Figura 5D), somente ASM e *P. sanguineus* mostraram-se superiores aos demais tratamentos. O indutor biótico *P. sanguineus* foi superior significativamente 13,2% e 52,6% em relação às testemunhas ASM e água destilada, respectivamente.

Para as cultivares BRS 310, BRS 610 e Agrocerees (Figuras 5C, 5E e 5F) não houve diferença significativa entre os tratamentos, mesmo que alguns compostos biológicos ativos apresentam potencial capaz de ativar mecanismos de defesa pós-formados bioquimicamente presentes para essa enzima.

Alguns trabalhos relacionados com indução de mecanismos de defesa colaboram com os resultados semelhantes encontrados nessa pesquisa, porém, com compostos biológicos diferentes. Kuhn (2007), avaliando a ativação de mecanismos de resistência em feijão tratado com suspensão de células de *Bacillus cereus* e acibenzolar-S-metil (ASM), observou ativação de β -1,3 glucanases somente para a aplicação de ASM, enquanto *B. cereus* não se mostrou eficiente na indução desta enzima.

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

Franzener (2011), estudando a caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso (EA) de *Eucalyptus citriodora*, verificou que para a enzima β -1,3 glucanase, em cotilédones de pepino, tanto ASM quanto o EA promoveram incremento nessa enzima, que foi de 139,0 e 122,7% em relação à testemunha água destilada, enquanto que para folhas de feijoeiro, apenas ASM promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima.

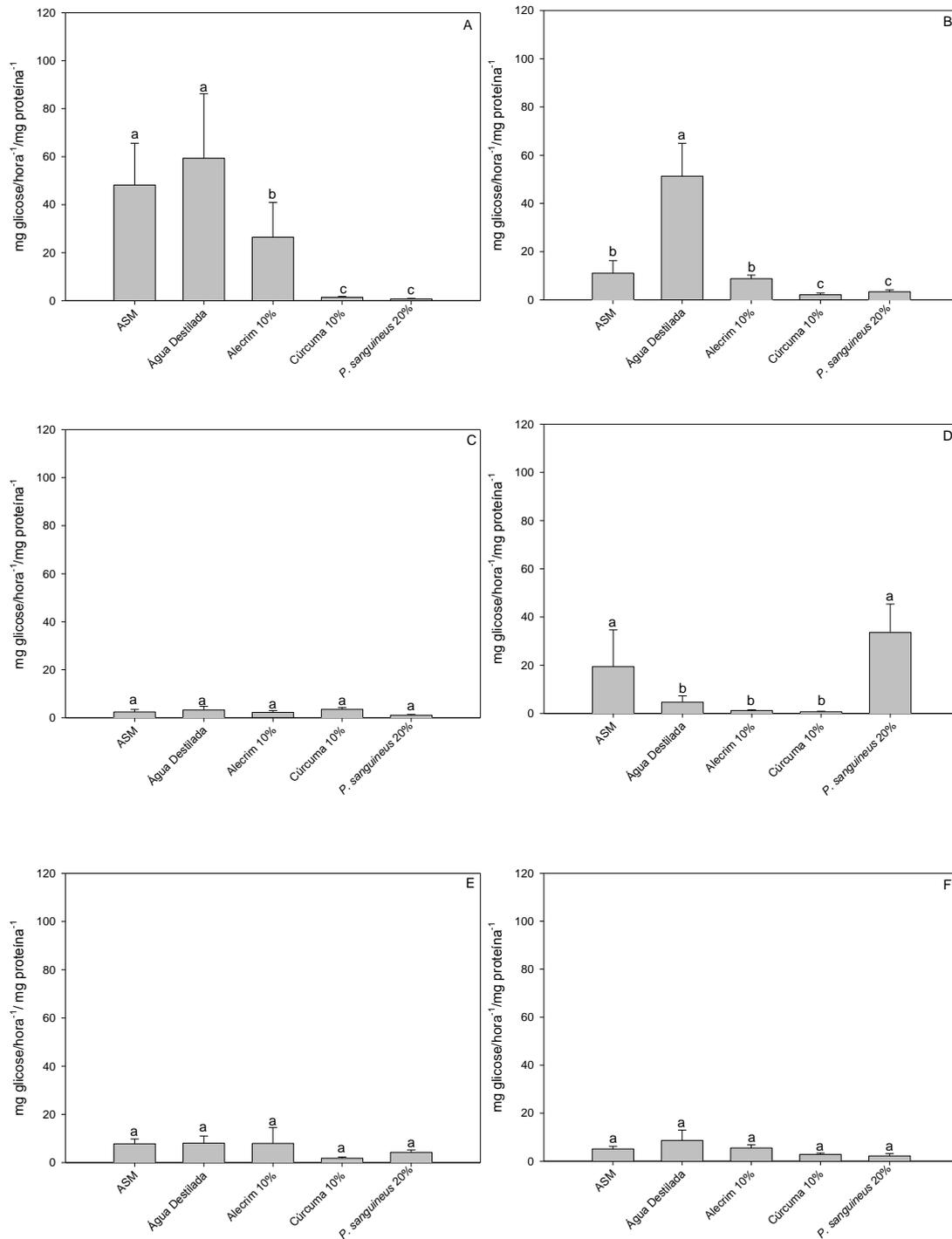


Figura 5 - Efeito da aplica\u00e7\u00e3o de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), c\u00facuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de β -1,3 glucanase em fol\u00edolos de sorgo. Barras representam o desvio padr\u00e3o. M\u00e9dias seguidas de mesma letra n\u00e3o diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).

4.2.5 Atividade de quitinase

Para a atividade da enzima quitinase na cultivar Brandes (Figura 6A) ASM não diferiu da água destilada e os extratos de alecrim, cúrcuma e *P. sanguineus* reduziram a atividade. Para a cultivar BRS 610 (Figura 6E) somente o indutor ASM mostrou-se superior aos demais tratamentos.

Para os genótipos BR 304, BRS 310, BR 601 e Agroceres (Figuras 6B, 6C, 6D e 6F) não houve diferenças significativas, sendo assim, não promovendo incremento na atividade dessa enzima.

Iurkiv (2008), estudando a purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *P. sanguineus* para controle de ferrugem asiática em soja verificou que para a enzima quitinase, tanto para os tratamentos obtidos por cromatografia de filtração em gel ou precipitação com sulfato de amônia, houve aumento significativo na atividade de quitinase três dias após o tratamento, sendo mais visível para o terceiro trifólio (tratado e inoculado) em relação ao quarto (não tratado e inoculado), além de maior atividade enzimática média para o terceiro trifólio em relação ao quarto. Entretanto, não obteve diferença estatística entre quaisquer tratamento durante o período de coleta.

Meinerz (2010) verificou que para a atividade de quitinases em sorgo por frações obtidas do decocto de *Adiantum capillus-veneris*, 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.

Franzener (2011) observou que para quitinase, nenhum dos tratamentos com extrato aquoso (EA) de *E. citriodora* promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima, tanto em cotilédones de pepino quanto em folhas de feijoeiro. Esses resultados sugerem que a ação do EA de *E. citriodora* nessas plantas não envolve, pelo menos de forma expressiva, a atividade dessa enzima, embora o ativador de plantas ASM também não tenha promovido aumento significativo na atividade.

Muller et al. (2011), trabalhando com atividades enzimáticas em soja induzidas por extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Zingiber officinale*, verificaram que para quitinase o extrato de alecrim a 15% incrementou em

99,5% a atividade, mostrando que estes resultados indicam o potencial desses extratos vegetais para induzir resistência em soja a fitopatógenos.

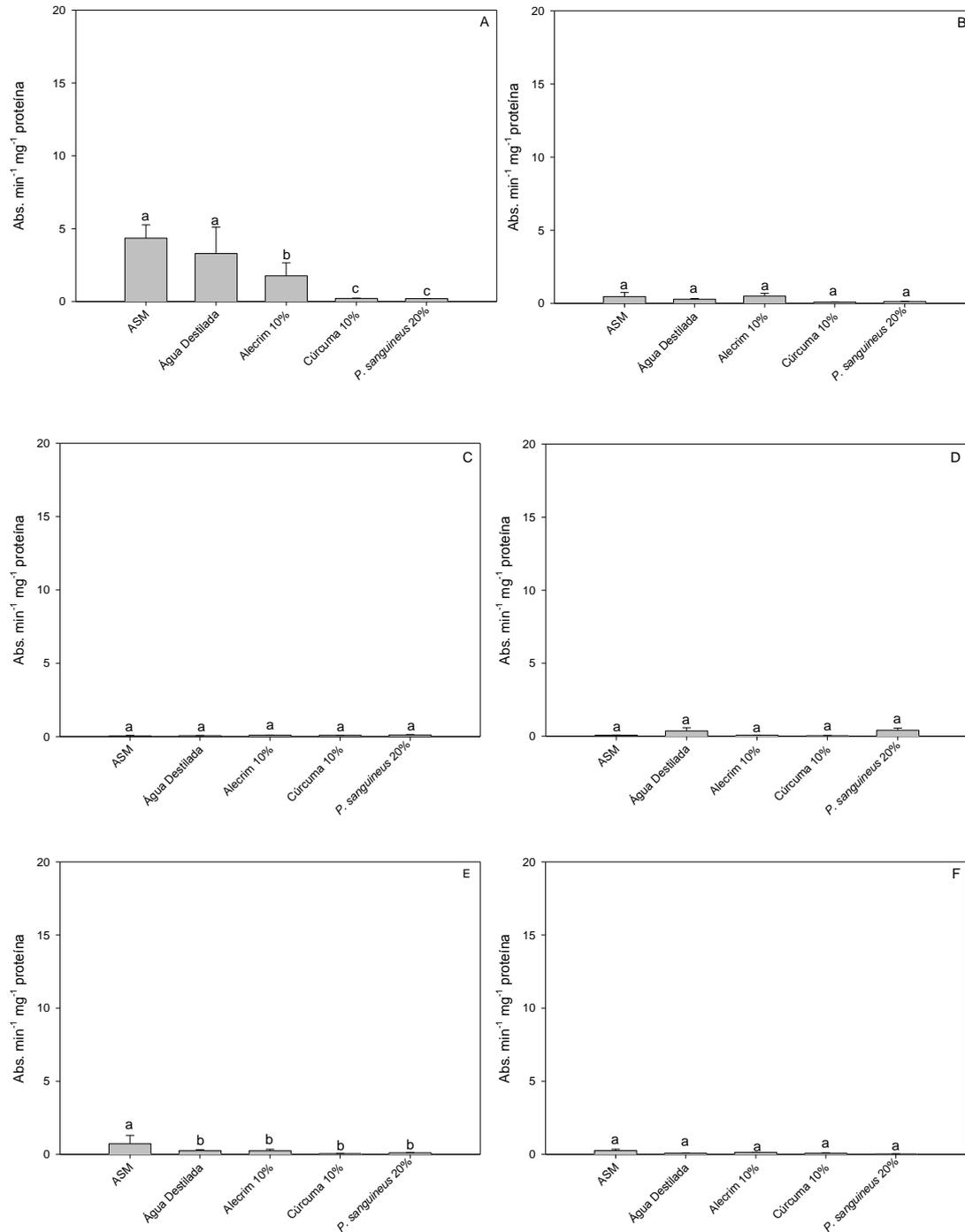


Figura 6 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* 20% para o sorgo nas cultivares: Brandes (A), BR 304 (B), BRS 310 (C), BR 601 (D), BRS 610 (E) e Agroceres 1080 (F), na atividade de quitinase em folíolos de sorgo. Barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). CV% = 19,66. ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.).

4.3 INDUÇÃO DE ENZIMA DE DEFESA EM PLÂNTULAS DE SORGO DA CULTIVAR BRANDES POR EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO

Com base nos melhores resultados obtidos na indução de fitoalexinas e enzimas relacionadas a defesa em mesocotilos de sorgo das cultivares Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agroceres 1080, destacou-se a cultivar Brandes, onde verificou a importância dos possíveis efeitos indutores de enzimas de defesa extratos vegetais e fúngicos ao longo do tempo.

As atividades de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3 glucanase tiveram comportamentos muito semelhantes. O indutor biótico alecrim proporcionou aumento significativo para o período de coleta de 144 horas após o tratamento (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D), enquanto que o extrato de cúrcuma apresentou as menores médias para essas atividades, não superando o indutor de referência acibenzolar-S-metil (ASM) e a testemunha água destilada.

Para quitinase (Figura 7E) nas primeiras horas após o tratamento com extrato de alecrim (tempo 0 até 48 horas) houve um incremento significativo de 34,5% quando comparado ao basidiocarpo *P. sanguineus*, porém nas 96 horas após o tratamento, teve uma redução de 22,3% em relação ao *P. sanguineus*, onde os dois promoveram o mesmo incremento nas 144 horas depois de serem tratadas as folhas das plântulas de sorgo, sendo 29,4% superior quando comparado ao ASM e 37,5% superior em relação a testemunha água destilada.

Kuhn (2007), estudando indução de resistência em feijoeiro por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus* nos aspectos bioquímicos, verificou que a atividade de quitinase não foi alterada significativamente com o indutor biótico *B. cereus*, porém, com a aplicação do indutor ASM, notou a elevação da atividade alcançando diferença significativa a 1% após a primeira e segunda aplicação, e a 5% após a terceira aplicação. O autor notou que após a primeira aplicação, onde todos os tratamentos receberam a mesma dose, os mesmos apresentavam aumento significativo na atividade em relação ao controle. As atividades de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foram alteradas significativamente em função dos indutores, bem como em função do número de aplicações ao longo do ciclo da cultura.

Iurkiv (2008), trabalhando com a caracterização parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para controle de ferrugem

asiática em soja, verificou que, de modo geral, a enzima peroxidase foi superior no terceiro trifólio (tratado e inoculado) em relação ao quarto trifólio (apenas inoculado), apresentando superioridade de 44,5%, indicando efeito principalmente local dos tratamentos empregados. Já a atividade de β -1,3 glucanase foi superior em geral para o terceiro trifólio (atividade local), sendo a maior indução observada três dias após o tratamento. No quarto trifólio observou diferença estatística para o tratamento com extrato bruto 20%, o qual se mostrou superior a fração protéica III e a testemunha água destilada já no primeiro dia após o tratamento.

Franzener (2011), quanto trabalhou com a caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso (EA) de *Eucaliptus citriodora*, observou que para a atividade de polifenoloxidasas, apenas o ativador de plantas ASM promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima, que ocorreu tanto em cotilédones de pepino quanto em folhas de feijoeiro. Por outro lado, o resultado do EA não diferiu estatisticamente do obtido pelo ASM e manifestou um sensível efeito sobre essa enzima ao apresentar efeito 88,4% superior ao apresentado pelo precipitado. Para os resultados da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) observou que em folhas de feijoeiro não foi verificada alteração significativa na atividade dessa enzima em função dos tratamentos. Já em cotilédones de pepino, ASM e EA foram capazes de estimular a atividade dessa enzima em 16,2 e 18,5%, respectivamente.

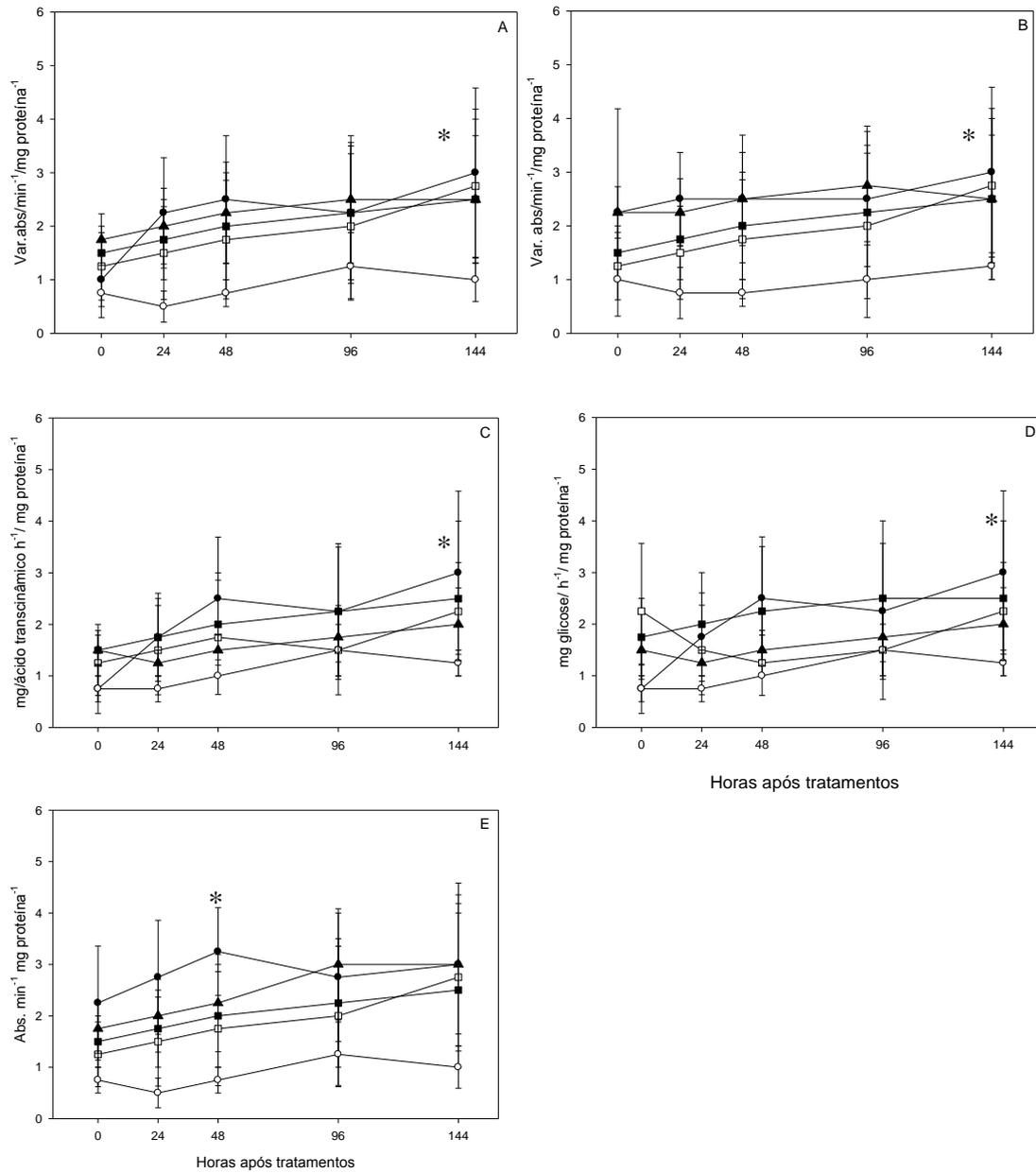


Figura 7 - Efeito da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (●), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (○) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (▲), controle água destilada (■) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (□) em plântulas de sorgo da cultivar Brandes, na atividade de peroxidase (A), polifenoloxidase (B), fenilalanina amônia-liase (C), β-1,3 glucanase (D) e quitinase (E). Barras representam o desvio padrão. * Indica diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV%(A) = 23,65; CV% (B)=16,59; CV%(C)=31,56; CV%(D)=17,55 e CV%(E)=20,11.

4.4 TROCAS GASOSAS

A taxa de assimilação líquida de CO_2 não sofreu alteração, verificando não ter interação entre as cultivares com a utilização dos três indutores bióticos, avaliada diariamente após a sua aplicação (Figura 8). Observou-se que durante a avaliação diariamente após a aplicação dos indutores, os compostos biológicos ativos promoveram um incremento contínuo e/ou com uma tendência de aumento nesta taxa de assimilação líquida de CO_2 , não tendo interferência na questão de custo metabólico e nem gerando um ponto negativo para esta variável, mas sim entre as cultivares, por apresentarem anatomia interna (abertura estomática) e externa (espessura foliar) diferentes.

Para a variável condutância estomática (g_s) (Figura 9), assim como para taxa de transpiração (E) (Figura 10) também não foi verificada interação entre as cultivares e os indutores bióticos de mecanismo de defesa de plantas durante o período avaliado, porém, os extratos vegetais e fúngico mostraram tendência de maior atividade durante os dias avaliados.

No entanto, observaram-se diferenças entre os indutores bióticos em relação à eficiência do uso da água (EUA) (Figura 11), e eficiência intrínseca do uso da água ($EIUA$) (Figura 12). Os maiores valores médios da (EUA) para o genótipo BRS 610, variável que relaciona a taxa de assimilação líquida de carbono fixada por unidade de água eliminada pelo mecanismo transpiratório, foi maior no indutor de referência (ASM), e extratos de cúrcuma e *P. sanguineus*, em relação ao extrato de alecrim, avaliados 48 horas após a aplicação do extrato (Figura 11e). Este comportamento mostra que houve maior fixação de dióxido de carbono por mol de água eliminada pela transpiração com valores, aproximados de 83,35% e 79,24% do ASM em relação ao extrato de alecrim e à testemunha água destilada. Da mesma forma, após 120 horas de aplicação dos tratamentos, o indutor ASM apresentou valores médios superiores quando comparado com à testemunha água. Durante este período pode-se observar que o ASM superou em 96,2% em relação à testemunha água. Estes resultados demonstram que o genótipo BRS 610, de modo geral apresenta menor transpiração comparada com seus valores de fotossíntese. O sorgo BRS 610 é um híbrido forrageiro com alto potencial produtivo de massa verde e matéria seca e grande quantidade de grãos na massa. Além de ter ciclo precoce, apresenta folhas lineares mais espessas, que por ter alto potencial produtivo e

produção de grãos em massa, a perda de água das folhas é menor quando comparado a assimilação líquida de CO₂ liberada para o ambiente.

Para a eficiência intrínseca do uso da água, avaliado após 48 horas da aplicação dos tratamentos na cultivar BRS 610, houve comportamento semelhante ao efeito da eficiência do uso da água mostrado na Figura (11e), onde o indutor ASM foi superior no efeito da *EIUA* quando comparado aos demais tratamentos (Figura 12e). Porém, estes resultados mostraram semelhança à testemunha água destilada e aos extratos cúrcuma e *P. sanguineus* e diferença estatística em relação ao extrato de alecrim, sendo superior em 85,5%, o mesmo comportamento foi obtido nas 120 horas de avaliação após a aplicação dos tratamentos. Onde se verificou alterações apenas no incremento para o indutor ASM em relação aos extratos de alecrim e *P. sanguineus* com 78,02% e 92,15%, respectivamente para a variável de *EIUA* na cultivar BRS 610 (Figura 12e).

Para as taxas de respiração (*R*) não houve diferenças significativas após a aplicação dos tratamentos em relação aos dias avaliados para as diferentes cultivares estudadas (Figura 13). Embora os extratos vegetais e fúngico não tenham mostrado efeito na assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração e respiração os mesmos alteraram a eficiência do uso da água e a eficiência intrínseca do uso da água, onde comprovou ter incremento nessas atividades. Porém, faz-se necessário o desenvolvimento de mais trabalhos relacionados com compostos biológicos ativos para elucidar os componentes presentes nos indutores bióticos em relação ao comportamento fisiológico da planta tratada.

As determinações de variáveis ecofisiológicas são muito importantes, não somente na compreensão do comportamento vegetativo das plantas, mas sobretudo no seu desempenho pontual em relação as respostas aos tratamentos impostos (NOGUEIRA; SILVA-JUNIOR, 2001). Desta forma, a quantificação das trocas gasosas realizadas nas folhas compreendendo assimilação líquida de CO₂, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂ na câmara subestômática, eficiência do uso de água, entre outros está intimamente relacionada ao estado hídrico do vegetal, bem como seu desenvolvimento (NOGUEIRA et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, a qualidade e a intensidade da luz são fatores ambientais que podem influenciar as trocas gasosas ocorridas nas plantas (COSTA; MARENCO, 2007).

Com base nisso, alguns trabalhos utilizando indutores vegetais podem fazer uma correlação com estas afirmações. Kuhn (2007), estudando a indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus* e analisando os aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção, verificou que a fotossíntese não sofreu alteração com a utilização dos dois indutores, avaliando diariamente após a sua aplicação, porém, também pode visualizar que ao longo do ciclo da cultura o comportamento dessa variável apresentou uma tendência de redução da atividade fotossintética pela aplicação do ASM, embora não tenha mostrado diferença significativa em nenhuma das épocas de coleta. Por outro lado, *B. cereus* não mostrou nenhuma tendência nessa avaliação. O mesmo autor avaliou a respiração da cultura diariamente após a aplicação dos indutores e verificou que foi aumentada em função dos mesmos, no entanto, apenas o indutor biótico (*B. cereus*) apresentou aumento significativo até o quarto dia após a aplicação, não se constatando diferença no sexta dia, e tendendo a voltar a normalidade. Para Verhagen et al. (2004) o indutor *B. cereus* não causou alteração fotossintética, visto que, na indução mediada por rizobactéria, geralmente o efeito não está na ativação de mecanismos de defesa, mas no pré-condicionamento.

Debona et al. (2012), trabalhando com plantas de trigo com inoculação de concentrações diferentes de *Pyricularia oryzae*, avaliando trocas gasosas, taxa líquida de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO₂ (Ci) e taxa de transpiração (E), verificaram que (A) decresceu em 99 e 78%, (gs) em 53 e 44%, e (E) em 43 e 38% às 96 h, nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Para (Ci) aumentou em 32 e 14% às 96 h nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em comparação às plantas não inoculadas. Esses resultados indicam que a redução no influxo de CO₂, causada pelo decréscimo na (gs), não foi o principal fator associado com a redução em (A) decorrente da infecção por *P. oryzae*, mas devido a limitações bioquímicas em nível dos cloroplastos. Assim, cultivares com maior nível de resistência à brusone tem a fisiologia menos afetada do que cultivares suscetíveis.

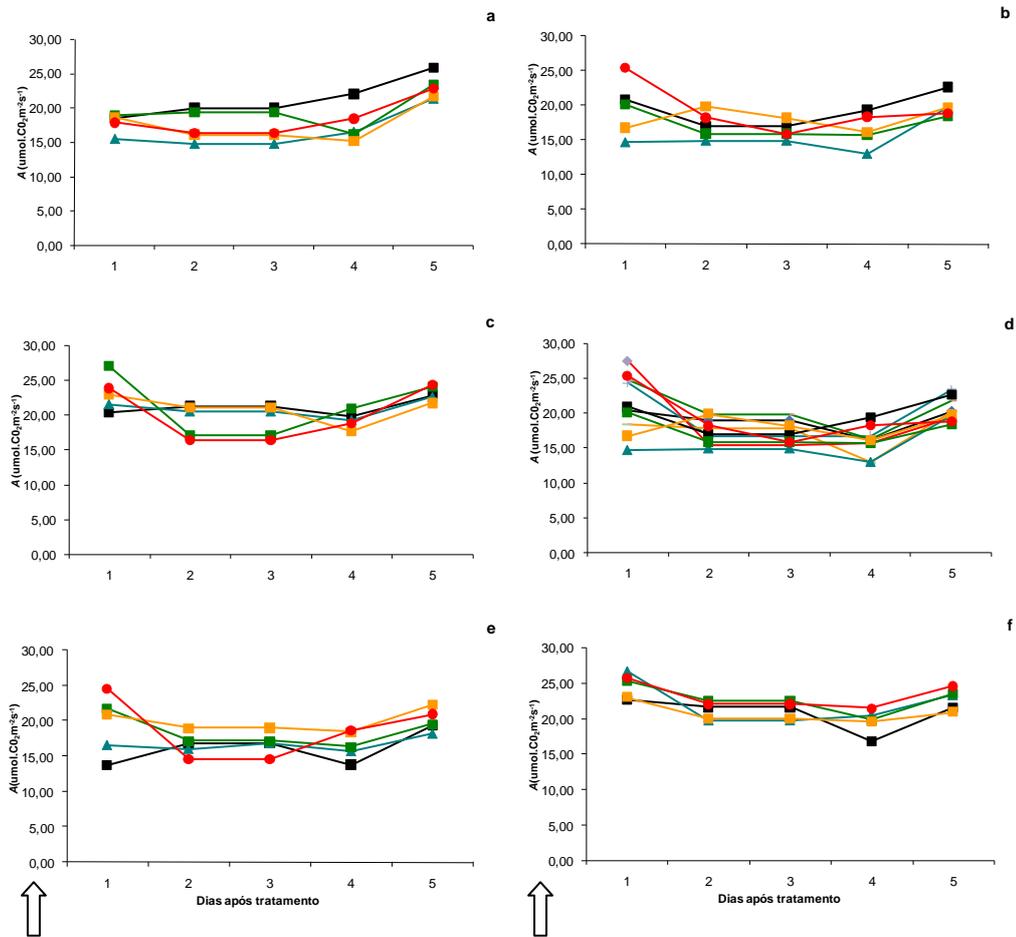


Figura 8 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 32,42 e DMS= 13,60; CV% 2º dia =23,13 e DMS= 8,30; CV% 3º dia =23,73 e DMS= 9,26; CV% 4º dia =25,05 e DMS= 8,58 e CV% 5º dia = 55,44 e DMS= 21,88. F: 2,06.

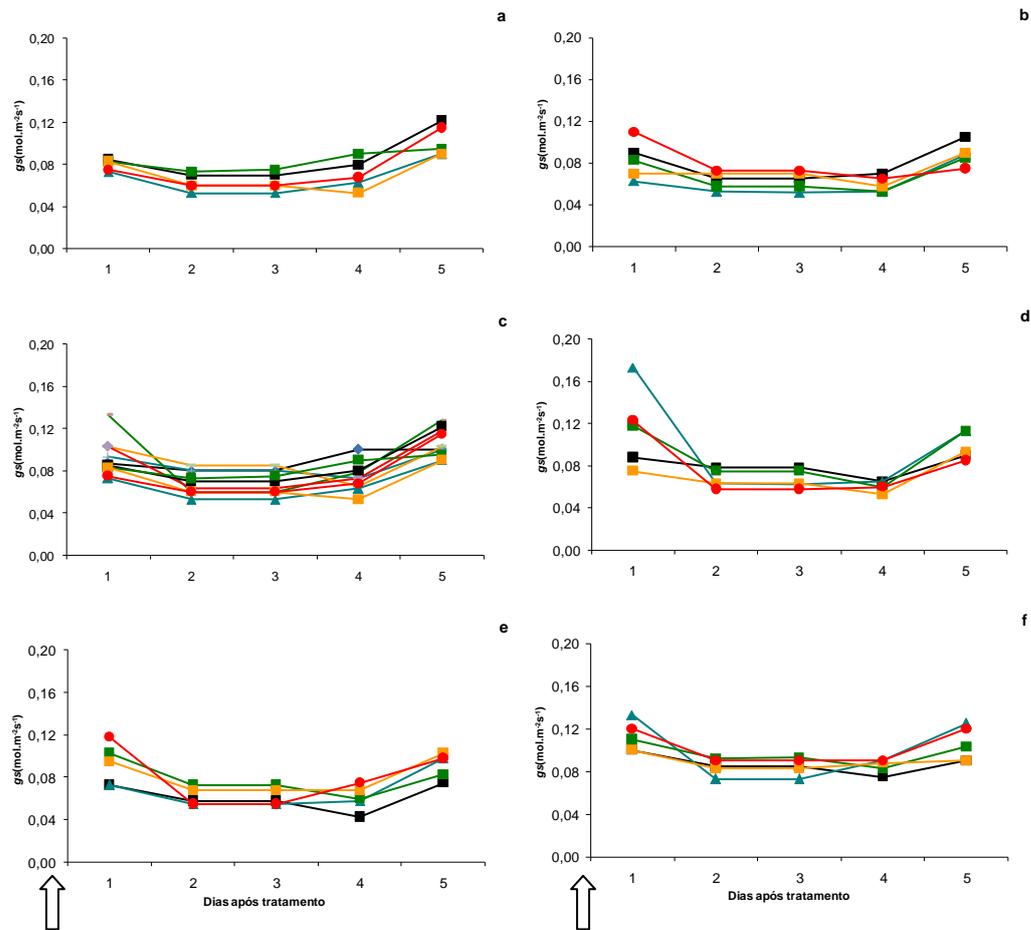


Figura 9 - Condutância estomática (gs) em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnopus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 35,77 e DMS= 0,07; CV% 2º dia =26,38 e DMS= 0,05; CV% 3º dia =26,38 e DMS= 0,04; CV% 4º dia =36,85 e DMS= 0,05 e CV% 5º dia = 28,75 e DMS= 0,06. F: 3,18.

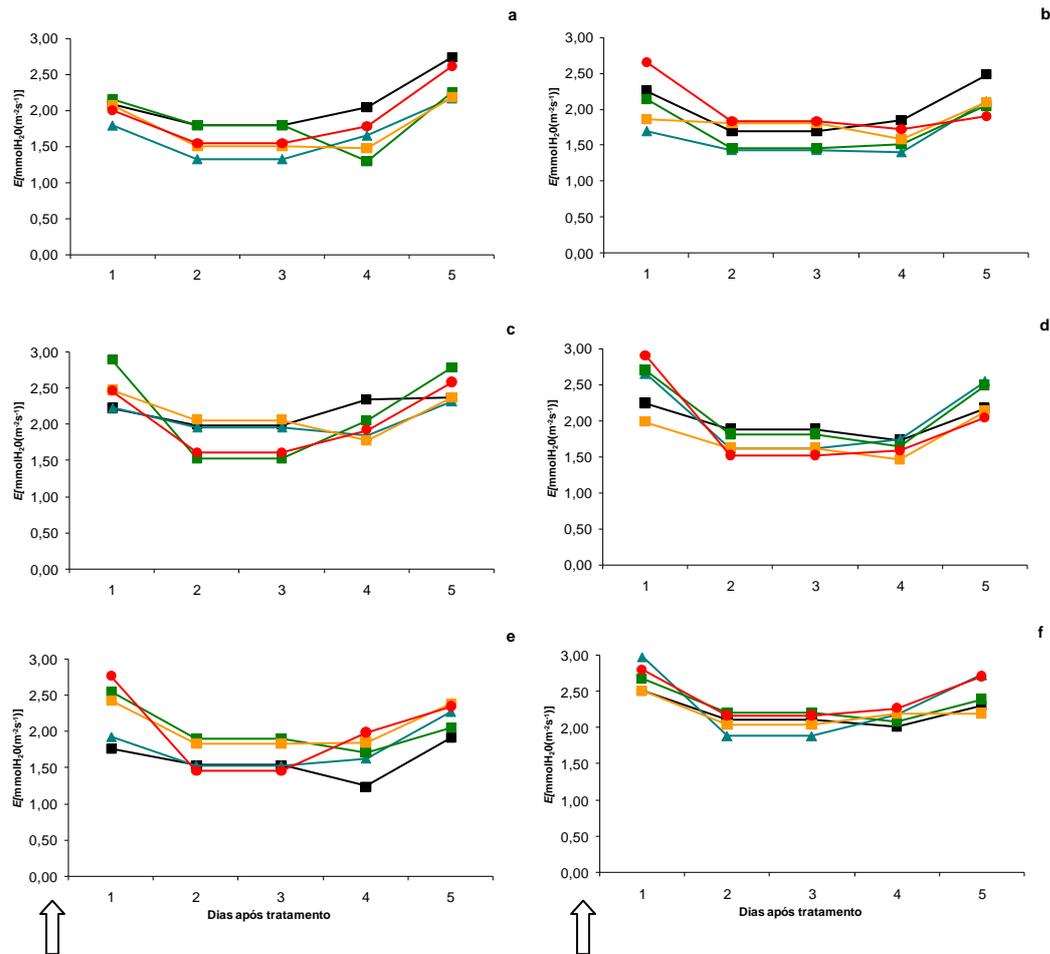


Figura 10 - Eficiência da taxa de transpiração da folha (E), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agrocerees 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 31,52 e DMS= 1,46; CV% 2º dia = 24,64 e DMS= 1,05; CV% 3º dia = 21,93 e DMS= 0,75; CV% 4º dia = 30,11 e DMS= 1,06 e CV% 5º dia = 22,18 e DMS= 1,02. F: 3,54.

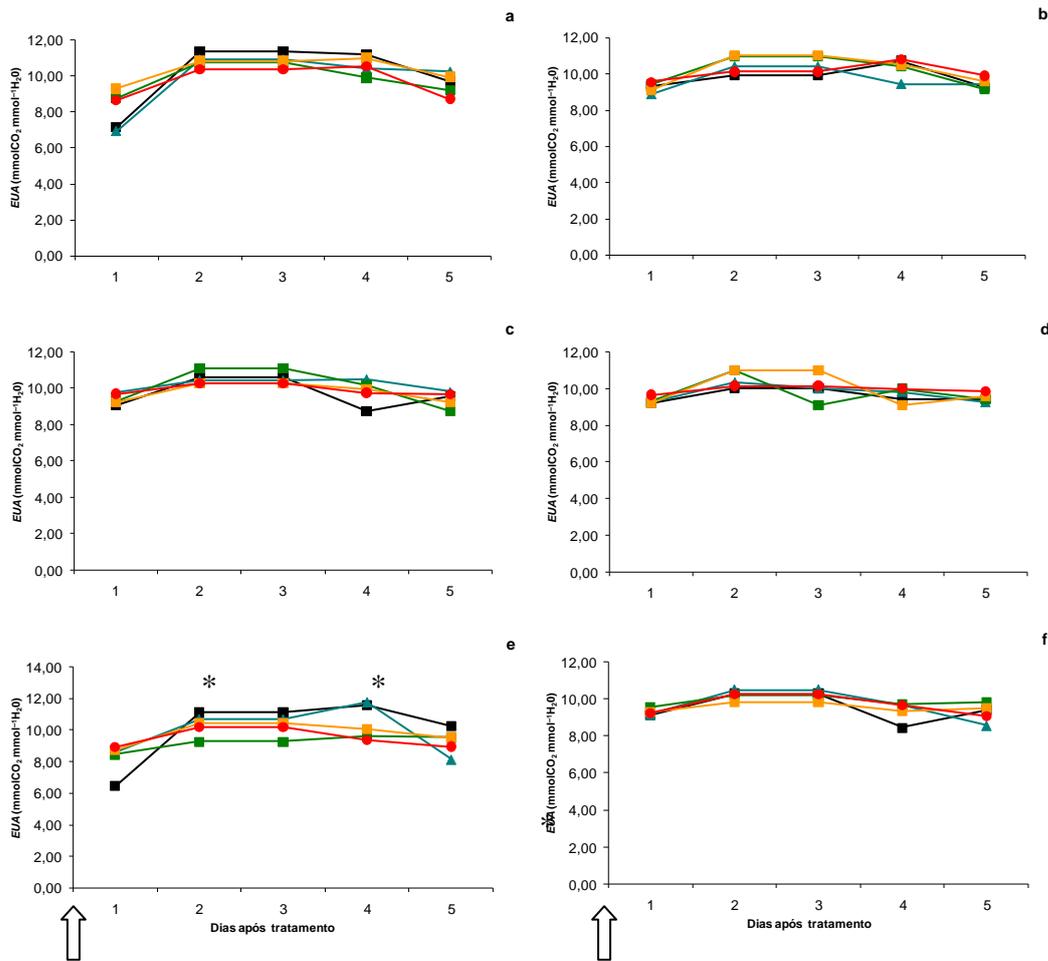


Figura 11 - Eficiência do uso de água (*EUA*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agrocerees 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 19,33 e DMS= 3,41; CV% 2º dia = 7,58 e DMS= 0,05; CV% 3º dia = 7,58 e DMS= 51,57; CV% 4º dia = 11,75 e DMS= 2,31 e CV% 5º dia = 9,71 e DMS= 1,80. F: 2,94.

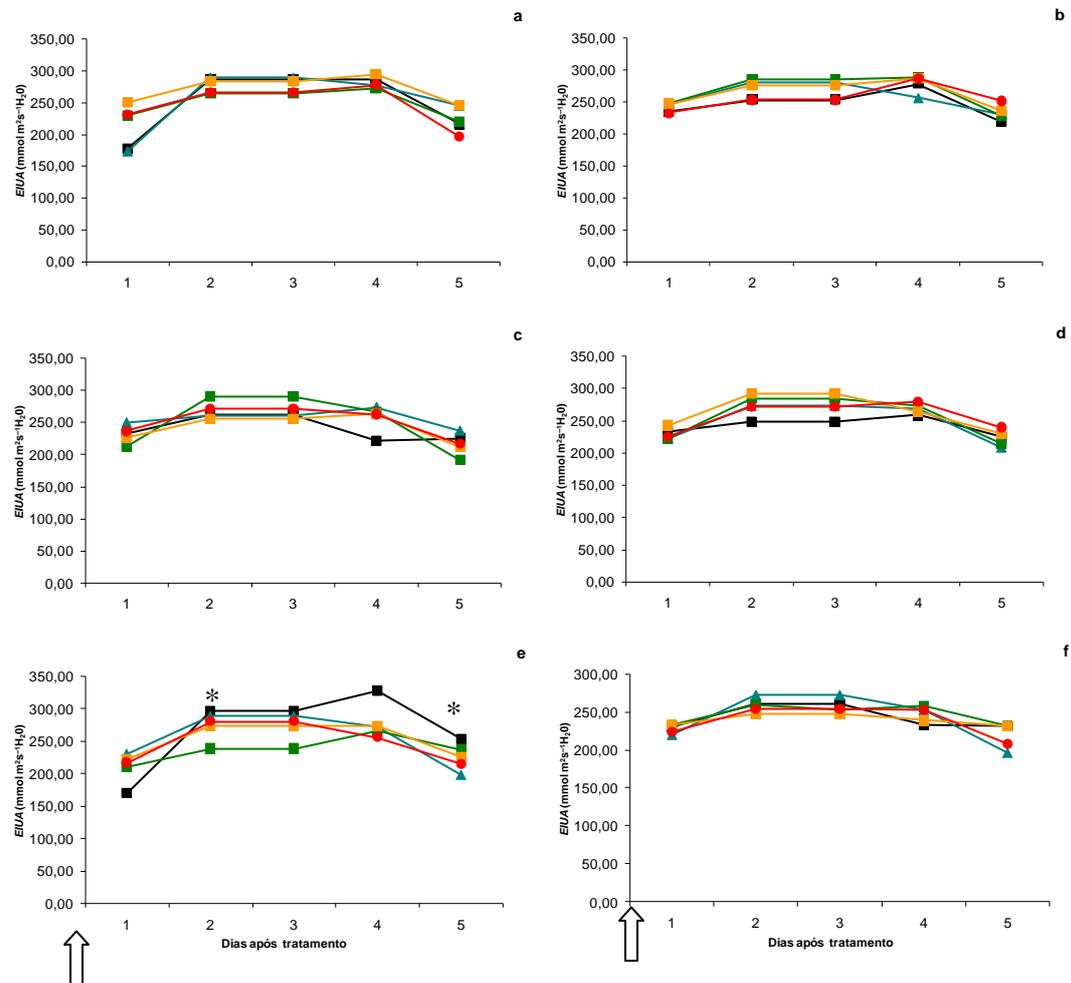


Figura 12 - Eficiência intrínseca do uso de água (*EIUA*), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L⁻¹ do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agroceres 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1^o dia = 21,84 e DMS= 24,68; CV% 2^o dia = 8,86 e DMS= 37,36; CV% 3^o dia = 8,86 e DMS= 47,26; CV% 4^o dia = 30,11 e DMS= 1,06 e CV% 5^o dia = 13,92 e DMS= 61,43. F: 3,42.

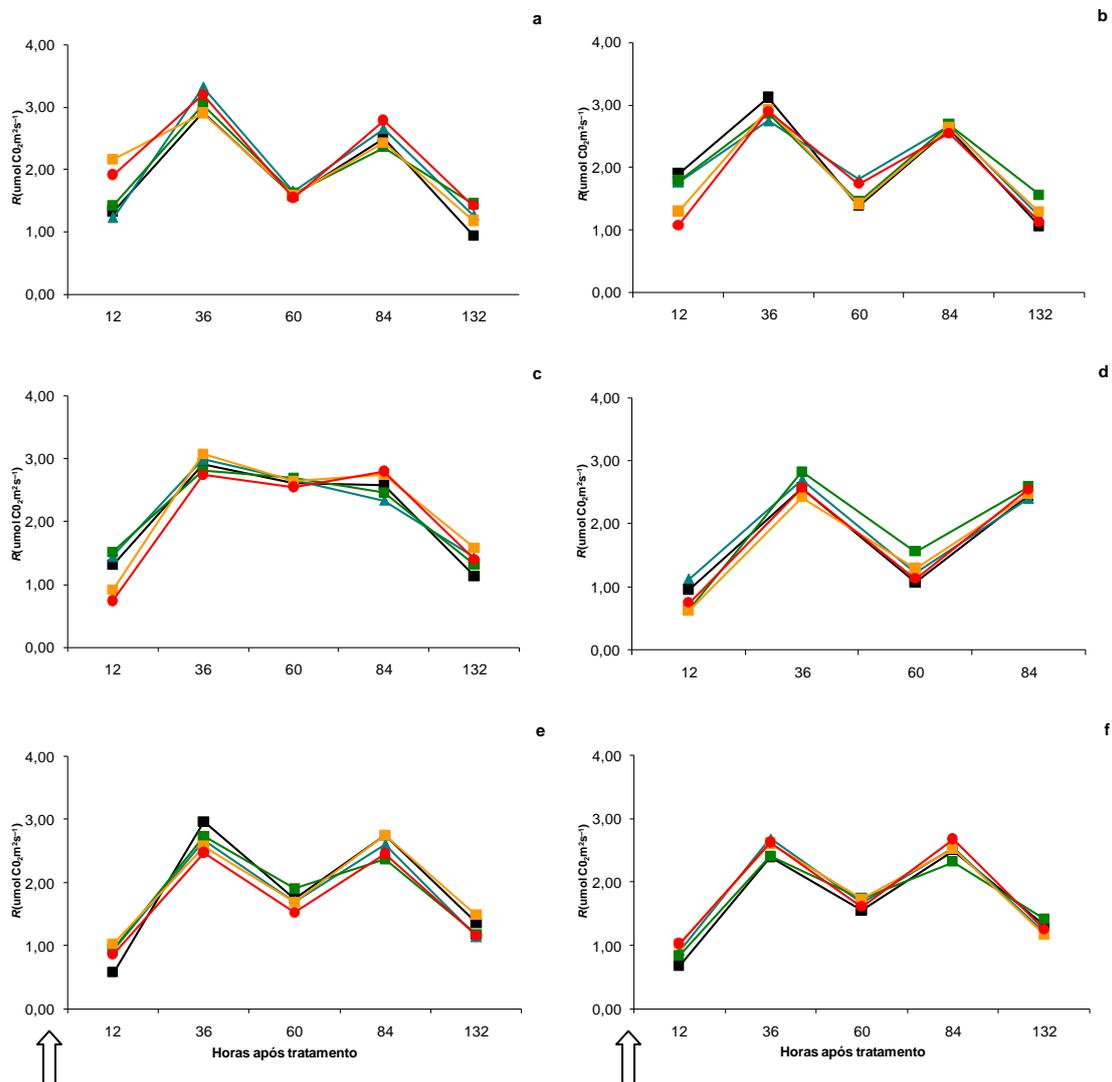


Figura 13 - Taxa de respiração (R), em função da aplicação de extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*) (■), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) (■) e *Pycnoporus sanguineus* 20% (●) e controle com água destilada (▲) e ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.) (■) na cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes (a), BR 304 (b), BRS 310 (c), BR 601 (d), BRS 610 (e) e Agrocerec 1080 (f). Seta indica o momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey quando se comparam os tratamentos dentro de cada tempo. CV% 1º dia = 46,79 e DMS= 1,07; CV% 2º dia = 13,18 e DMS= 0,72; CV% 3º dia = 22,61 e DMS= 0,29; CV% 4º dia = 11,79 e DMS= 0,59 e CV% 5º dia = 56,84 e DMS= 1,46.F: 2,48.

4.5 PRODUTIVIDADE E PARÂMETROS DE PRODUÇÃO

Para os parâmetros massa fresca e massa seca de parte aérea, massa de panícula, massa de raiz, número de grãos, massa de grãos, número de panícula e volume de raiz, não houve diferença significativa com relação aos tratamentos aplicados semanalmente, evidenciando possível ausência de custo metabólico pela aplicação dos extratos vegetais e fúngico (Tabelas 1 e 2). Porém, houve diferença significativa apenas entre as cultivares.

A cultivar BR 304 apresentou superioridade significativa para massa fresca entre as demais cultivares, enquanto que as cultivares Brandes, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees mostraram-se semelhantes para essa variável. Para massa de panícula a cultivar BRS 610 foi superior as demais cultivares testadas, oposto da cultivar Brandes que apresentou menor média para essa variável. Para os parâmetros de massa seca total e de raiz nenhuma cultivar apresentou diferença significativa (Tabela 1).

Para os parâmetros de número de grãos e massa de grãos somente a cultivar BRS 610 apresentou significância, sendo semelhante nestes mesmos parâmetros a cultivar BRS 310. No número de panícula também teve destaque a cultivar BR 601, e apresentando menor média a cultivar Agrocerees para esta variável. Entretanto a mesma teve superioridade no volume de raiz, sendo estatisticamente superior as demais cultivares neste parâmetro (Tabela 2).

Kuhn (2007) verificou que houve redução da massa seca e produtividade, causada pelo indutor ASM em diferentes momentos de aplicação em feijoeiro. Essa redução de produtividade ocorreu principalmente pela redução do número de grãos de feijão, uma vez que, o tamanho do grão não sofreu alteração, o que é refletido na variável peso de 100 sementes, a qual não apresentou diferença significativa. A variável número de grãos por vagem também foi afetada, sofrendo redução pela aplicação de ASM, no entanto, o autor verificou que a variável número de vagens não foi afetada pela aplicação do indutor ASM. Já o indutor biótico *B. cereus* não afetou a produtividade das plantas, bem como nenhuma das variáveis relacionada aos parâmetros de produção foram alterados significativamente.

Muller (2011), avaliando custo adaptativo da indução de resistência por *Saccharomyces boulardii* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) constatou que não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados, evidenciando

possível ausência de custo metabólico pela aplicação da levedura. Esse possível custo adaptativo pode ter sido ocultado pelo estado nutricional equilibrado das plantas, assim como por possível indução de resistência em todos os tratamentos pelas condições locais de cultivo e manejos empregados. Em condições agrícolas nutricionais e ambientalmente equilibradas, aplicações foliares da levedura *S. boulardii* não resultam em custo energético aparente.

Hoffmann et al. (2012), trabalhando com controle do cretamento bacteriano comum por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente, verificaram que as plantas tratadas com indutores bióticos bem como as plantas pré-tratadas com ASM, apresentaram maior produtividade, maior massa de grãos e menor severidade de doença. Também observaram que as plantas tratadas com leveduras reduziram a severidade do cretamento bacteriano comum do feijoeiro e aumentaram sensivelmente a produtividade. Em condições de campo sob estresse hídrico, a aplicação de ASM proporciona custo metabólico, reduzindo a produtividade sem reduzir a severidade da doença. O óleo essencial de laranja não reduziu a severidade, porém, não interferiu nos parâmetros produtivos.

Tabela 1 - Massa fresca e seca de parte aérea, massa de panícula e massa seca de raiz em função dos tratamentos com extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees 1080, aplicados semanalmente ao longo do ciclo da cultura. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).

Tratamentos	Massa fresca	Massa seca	Massa de panícula	Massa seca de raiz
Acibenzolar-S-metil	195,99 ^{ns}	46,76 ^{ns}	7,20 ^{ns}	38,34 ^{ns}
Água Destilada	183,10	44,04	8,21	40,35
<i>R. officinailis</i> 10%	169,96	48,49	8,40	40,72
<i>C. longa</i> 10%	169,28	49,23	8,46	38,46
<i>P. sanguineus</i> 20%	183,01	46,18	8,63	38,23
Cultivares				
Brandes	196,88 AB ¹	44,16	4,68 C	43,20
BR 304	201,12 A	44,51	9,11 AB	39,50
BRS 310	170,84 AB	46,49	7,52 BC	37,05
BR 601	185,08 AB	47,66	9,25 AB	37,96
BRS 610	173,01 AB	50,97	11,31 A	37,80
Agrocerees	154,66 B	47,85	7,20 BC	39,79
Média	180,27	46,94	8,18	39,22
CV	26,27	21,67	46,54	32,91

¹ médias seguidas por mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

^{ns} não significativo

Tabela 2 - Número de grãos, massa de grãos, número de panículas e volume de raiz em função dos tratamentos com extratos de alecrim 10% (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma 10% (*Curcuma longa*) e *Pycnopus sanguineus* 20% para a cultura de sorgo nas seguintes cultivares: Brandes, BR 304, BRS 310, BR 601, BRS 610 e Agrocerees 1080, aplicados semanalmente ao longo do ciclo da cultura. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg L^{-1} do i.a.).

Tratamentos	Nº de grãos	Massa de grãos	Nº de panículas	Volume de raiz
Acibenzolar-S-metil	159,33 ^{ns}	2,21 ^{ns}	4,46 ^{ns}	86,04 ^{ns}
Água Destilada	154,25	2,20	4,33	88,54
<i>R. officinailis</i> 10%	150,92	2,22	4,58	82,08
<i>C. longa</i> 10%	179,75	2,68	4,71	84,79
<i>P. sanguineus</i> 20%	202,04	3,26	4,25	94,38
Cultivares				
Brandes	152,70 B ¹	2,02 B	3,40 BC	79,50 B
BR 304	104,65 B	1,92 B	4,90 AB	81,25 B
BRS 310	202,50 AB	3,00 AB	4,50 AB	90,25 AB
BR 601	140,40 B	1,86 B	6,10 A	81,50 B
BRS 610	272,30 A	4,15 A	5,20 A	89,25 AB
Agrocerees	143,00 B	2,12 B	2,70 C	101,25 A
Média	169,25	2,51	4,47	87,17
CV	75,95	75,17	41,93	24,05

¹ médias seguidas por mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

^{ns} não significativo

5 CONCLUSÕES

Os indutores bióticos alecrim, cúrcuma e *Pycnoporus sanguineus* induziram fitoalexinas em mesocótilos e atividades bioquímicas nas diferentes cultivares de sorgo, podendo ressaltar que os resultados revelam um importante alvo de ação de elicitores presentes nesses extratos.

De forma geral, o extrato de alecrim causou incremento na atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase; o extrato de cúrcuma induziu a atividade de fenilalanina amônia-liase e o extrato de *P. sanguineus* as atividades de polifenoloxidase e β -1,3 glucanase.

O indutor ASM interferiu no metabolismo da cultivar BRS 610 de sorgo em relação à eficiência do uso da água (*EUA*) e eficiência intrínseca do uso da água (*EIUA*), sem interferir na produtividade, melhorando a qualidade da produção e melhorando acentuadamente o número de panícula, massa de panículas, número de grãos e massa de grãos. Os extratos vegetais e fúngico não interferiram nesses parâmetros.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press. p. 207-248, 2005.
- ALVAREZ V., V.H.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; LOPES, A. S. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. Aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p.25-32.
- AMARAL, J. A. T. do; RENA, A. B.; AMARAL, J. F. T. do. Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e suas relações com fotoperíodo, frutificação, resistência estomáica e fotossíntese. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 3, p. 377-384, 2006.
- APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p.163-169, 1995.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96 (5), p. 723-728, 2001.
- ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L.L. Studies on de effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.6, p.791-794, 1999.
- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.)**. Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 51 p. 2005.
- BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, R.S.; MONICKRARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**, v.28, n.6, p.715-721, 2003.
- BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – II Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.401-404, 2006.
- 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.

BECKER, A.; VIGO-SCHULTZ, S.C.; STANGARLIN, J.R.; BALBI-PEÑA, M.I.; KLAHOLD, C.A. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, (Suplemento), p.163, 2004.

BENETT, 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.

BEVENUTI, S.; MACHIA, M. Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L. seeds. **Environmental and Experimental Botany**, 38: 61-71. 1997.

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.; 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.

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

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. Palo Alto, USA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

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

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

BRAND, S. C.; BLUME, E. MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; SCHEREN, M. B.; ANTONELLO, L. M. Extrato de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1881-1887, 2010.

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

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

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.; 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.

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.

COELHO, A.M.; CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Rendimento de milho no Brasil: Chegamos ao máximo. In: **Simpósio Rotação Soja/Milho no Plantio Direto**, 3., Piracicaba, CD-Rom (In press). 2002.

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.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. FUNEP. Jaboticabal, 1994.

CORREA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais do cultivo à terapêutica**. Editora Vozes, 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 1. p. 21-22, 1984.

COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica** . 37: 229-234. 2007.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; **Cultivo do sorgo – Sistema produtivo**. Boletim Técnico, EMBRAPA. n. 2. 8º Ed. 2012.

DEBONA, D.; RIOS, J.A.; RODRIGUES, F. A.; MARTINS, S. C. V.; PEREIRA, L. F.; DAMATTA, F. M. Trocas gasosas em plantas de trigo infectadas por *Pyricularia oryzae*. In: **Anais: Tropical Plant Pathology 38 (Suplemento)**, 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia – Manaus - AM. 2012.

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 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.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, H. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant, Cell and Environment**. Oxford, v. 28, p. 211-222. 2005.

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

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. DE; SANTOS, M. DE O.; ARANTES, L. DE O. Influência de diferentes condições de sombreamento sobre o crescimento de *Tapirira guianensis* Alb. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 5: 447-479. 2007.

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.

FERRAZ-GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Caesalpinoideae). **Bragantia**, 65: 37-42. 2006.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Passo Fundo: Ed. da UPF, 2004.

FORMENTINI, H. M.; TOILLIER, S. L.; IURKIV, L.; MOERS, E. M; MEINERZ, C. C; ESTEVEZ, R. L.; CRUZ, M. I. F.; DILDEY, O. F. MÜLLER, S. F.; MARTINAZZO-PORTZ, T.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Atividades bioquímicas em sorgo induzidas por extratos vegetais de alecrim, cúrcuma e gengibre. In: **Anais: Tropical Plant Pathology** 36 (Suplemento), XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Bento Gonçalves RS. 2011.

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. **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.

FRANZENER, G. **Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalypto citriodora***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 127 p. 2011.

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.

GAYLER, S. et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in Young Apple trees. Springer Berlin / Heidelberg. **Trees**, v. 18, p. 363-371, 2004.

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, 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.

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.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v.95, n.6, p.641-655, 1991.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. Oxford, UK. **Annals of Botany**, v. 89, p. 503-512, 2002.

HERTWIG, I. F. G. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo: Editora Ícone. 1986.

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.

HOFFMANN, M. R. B.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R.; BATTISTUS, A. G.; STULP, J. L.; MEINERZ, C. C. Controle do cretamento bacteriano comum por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente. **Revista Cultivando Saber**. v.5, n.4, p.8-23, 2012.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p.206-210, 2001.

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.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; STANGARLIN. J.R.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.241-244, 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.

JURKIV, 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.

JABEEN, R.; ASHRAF, M.; AHMAD, I.; IFTIKHAR, T. Purification and bioassays of bioactive fraction from *Curcuma longa* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing BLB disease in rice. **Pakistan Journal of Botany**. v.43, n.2, p.1335-1342, 2011.

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.

KENDRICK, R.; KRONENBERG, G. H. M. **Photomorphogenesis in Plants**. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 85 p. 1994.

KINOSHITA, T.; DOI, M.; SUETSUGU, N.; KAGAWA, T.; WADA, M.; SHIMAZAKI, K. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. **Nature**, v. 414, p. 656-660, 2001.

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.

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.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: RODRIGUES, F.; ROMEIRO, R. da S. **Anais da III Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos.** Viçosa, p. 67-90, 2007.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**. v.27, n.1, p.13-20, 2006.

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

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species**. Australian National Botanic Gardens, Fungi Web Site. <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html>. 2008. Acesso em 17/12/2012.

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

LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China**. Part B, Life Sciences, v.25, n.2, p.59-66, 2001.

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.

LOGEMANN, E. et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **The Plant Journal**, v. 8, p. 865-878, 1995.

LOPES, M. N.; POMPEU, R. C. F. F.; SILVA, R. G.; REGADAS FILHO, J. G. L.; BESERRA, L. T.; LACERDA, C. F. Trocas gasosas e índice de crescimento em capim-braquiária manejado sob lâminas de irrigação e idades de crescimento. **Revista Agro Ambiente**. On line. v.7, p. 10-17, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512 p. 2002.

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

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

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; SCHAFFERT, R. E. **Fisiologia da planta de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. 46p. (Embrapa Milho e Sorgo - Circular Técnica, 3).

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.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220p. 2000.

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.1, p.09-13, mar. 2010.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 10: 102-107. 2008.

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

MAZUMDER, A.; RAGHAVAN, K.; WEINSTEIN, J.; KOHN, K.W. & POMMIER, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.8, p.1165-1170, 1995.

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. **Indução de mecanismos bioquímicos de defesa em sorgo (*Sorghum bicolor*) por frações obtidas do decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*)**. Marechal Cândido Rondon, 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 103 p. 2010.

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

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 Medicinais**, v. 10, n. 2, p. 26-31. 2008.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 67, n. 3, p. 277-285, 2006.

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.

MIQUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J.M.; DÍAZ-ALPERI, J.; RAMÍREZ, A. The curcuma antioxidant: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.34, n.1, p.37-46, 2002.

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.

MULLER, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência por *Saccharomyces boulardii* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Marechal Cândido Rondon, 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 43 p. 2011.

MULLER, S. F.; MEINERZ, C. C; MOERS, E. M; FORMENTINI, H. M.; TOILLIER, S. L.; IURKIV, L.; ESTEVEZ, R. L.; CRUZ, M. I. F.; DILDEY, O.; O. F.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. **Atividades enzimáticas em soja induzidas por extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Zingiber officinale***. In: **Anais: Tropical Plant Pathology 36** (Suplemento), XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Bento Gonçalves RS. 2011.

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

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

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

NOGUEIRA, R. J. M. C. ; SILVA-JUNIOR, J. F. DA ; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; BURITY, H. A.; SANTOS, V. F. Comportamiento estomático y tensión de agua en el xilema de dos genotipos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) cultivados bajo estrés hídrico. **Revista de Investigación Agraria Série Produção y Protección Vegetales**, Madrid, 15: 213-225. 2000.

NOGUEIRA, R. J. M. C. ; SILVA-JUNIOR, J. F. Resistência estomática, tensão de água no xilema e teor de clorofila em gravioleira (*Annona muricata* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, 58: 491-495. 2001.

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.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*, **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.1775–1780, 2002.

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.

PACCOLA, A.S.; MAKI, C.S.; NÓBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal Microbiology**, v.32, n.3, p.176-178, 2001.

PAIVA, A. S.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D.; TURCO, J. E. P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, 25: 161-169. 2005.

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

PANIZZI, R. C.; FERNANDES, N. G. CAMARGO, M. Doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; (Eds). **Manual de Fitopatologia – Doenças de Plantas Cultivadas**. Ed. Ceres, 2005. p. 597-606.

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.

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. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Volume 1: princípios e conceitos. 4.ed., Piracicaba: Agronômica Ceres, p.593-633, 2011.

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

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 antioxidants 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.

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 *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 285-292, 2008.

PEIXOTO, P. H. P.; MATTA, F. M. da; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 4, p. 821-832, 2002.

PINTO, N. F. J. A. Tratamento químico de grãos de sorgo úmidos visando o controle de fungos de armazenagem. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Vicoso, v.26, n.2, p.55-59, 2001.

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.

RIBEIRO, P.G.F.; DINIZ, R.C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 218p. 2008.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic of sweet Orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 62, p. 167-173. 2003.

RÖDER, C.; STANGARLIN, J.R.; PAZUCH, D.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F Controle alternativo de podridões no morango com tratamentos em pré-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (Suplemento), p.201, 2007.

RODRIGUES, E. **Atividade antimicrobiana *in vitro*, indução de peroxidase e controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface cultivado organicamente pelo uso de extrato de gengibre**. Maringá, 2004. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá.

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.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; BERNARDO, R.; STANGARLIN, J. R. Potencial de *Zingiber officinale* (gengibre) no controle de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia brasileira**. 24 (Suplemento), 321, 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.

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

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

SCHIMIDT, A. A. P. **Sorgo**. Editora Ícone: Coleção Brasil Agrícola, p. 63, 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.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; VIECELLI, C. A.; DI PIERO, R. M.; SILVA, C. M.; MESQUINI, R. M.; SANTOS NETO, J.; STANGARLIN, J. R. Extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 177-205, 2012.

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

SILVA, A. G. et.al. Avaliação agronômica de cultivares de sorgo forrageiro no sudoeste do Estado de Goiás em 2005. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.6, n.1, p.116-127, 2007.

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, I.; SANT'ANA, D. M. G. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste, 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.

SILVA, L. H. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, R. J.; Efeito indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 29, n. 3, p 244-248, 2003.

SILVEIRA, F A. O.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G. W. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marsetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta botânica brasileira**. 18: 847-851. 2004.

SMÂNIA, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, n.3, p.177-181, 1995a.

SMÂNIA, A.; SMÂNIA E.F.A.; CRUZ, F.S.; BENCHETRIT, L.C. Growth and production phases of *Pycnoporus sanguineus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.26, n.3, p.236-238, 1995b.

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

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

SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. **Nature**, 407: 585-591. 2000.

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.; RESNEDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 51-80, 2005.

SOMSSICH, I. E.; HAHBROCK, K. Pathogen defense in plants: a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 86-90.1998.

STANGARLIN, J. R., PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C.; A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bisfosfato 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., 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.

STANGARLIN, J. R.; VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ASSI, L. PORTZ, R. L.; MEINERZ, C. C. Plant defense enzymes activated in bean plants by aqueous extract from *Pycnoporus sanguineus* fruiting body. In: DHAL, N. K.; SAHU, S. C. **Plant Science**. In Tech, 2012, p. 153-166.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J. Evidência de custo adaptativo da resistência induzida por ASM e extratos de plantas medicinais em tomateiro fertirrigado. **Summa Phytopathologica**, v.35, (Suplemento), p.1-3, 2009.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 1ª ed. Badajoz-Espanha: Formatex Research Center, v.2, p.1033-1042, 2011.

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.

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004a.

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

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

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.

TOILLIER, S.; VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; IURKIV, L. KUHN, O.J.; Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

UECHI, S.; MIYAGI, Y.; ISHIMINE, Y.; HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v.44, n.2, p.138-140, 2000.

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.

VAN LON, L. C.; VAN STREIN, E. A. The families os patogénesis-related proteins, their activities, and comparative análise 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.

VERHAGEN, B. W. M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU, T.; CHANG, H. S.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. The transcriptome of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Microbe Interaction**. Sant Paul, v. 17, p. 895-908. 2004.

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

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.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

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.

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.

VIGO-SCHULTZ, S.C. **Avaliação da indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijão vagem**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 78p. 2008.

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

WHITELAM, G. C.; DEVLIN, P. F. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. **Plant Cell and Environment**, 20: 752-758. 1997.

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.

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.

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.

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.