



# Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*

Clair Aparecida Vicelli<sup>1</sup>, José Renato Stangarlin<sup>1</sup>, Odair José Kuhn<sup>1</sup> & Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Autor para correspondência: José Renato Stangarlin, e-mail: jrstangarlin@unioeste.br

## RESUMO

Com o objetivo de desenvolver métodos alternativos para o controle da mancha angular do feijoeiro, causada por *Pseudocercospora griseola*, filtrados de cultura de *Pycnoporus sanguineus* foram testados contra *P. griseola*. Foi investigado ainda o potencial desses filtrados em ativar enzimas de defesa do feijoeiro, como peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase, bem como alterar teores de proteína total e clorofilas. Para os experimentos *in vitro* e em casa de vegetação foram utilizados extratos de filtrado de cultura de *P. sanguineus* em concentrações variando de 1 a 20% e os controles água, acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>). No experimento *in vitro*, o extrato não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento micelial, na esporulação e na germinação de conídios de *P. griseola*. A área abaixo da curva de progresso da mancha angular foi reduzida em 82 e 49% respectivamente, nas plantas cultivadas em casa de vegetação e no campo em relação ao controle água. A atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e os teores de proteínas e clorofilas foram maiores nas plantas tratadas com o extrato. Estes resultados indicam a eficiência do filtrado de cultura de *P. sanguineus* para o controle alternativo da mancha angular do feijoeiro.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, *Phaeoisariopsis griseola*, controle alternativo, proteínas relacionadas à patogênese.

## ABSTRACT

### Induction of resistance in beans against *Pseudocercospora griseola* by culture filtrates of *Pycnoporus sanguineus*

With the aim of developing an alternative method for the control of angular leaf spot of common bean, caused by *Pseudocercospora griseola*, aqueous extracts of *Pycnoporus sanguineus* culture filtrates were evaluated *in vitro* for antimicrobial activity against *P. griseola*, and possible induction of resistance in bean against *P. griseola*. The role of the defense enzymes peroxidase, polyphenol oxidase, and  $\beta$ -1,3-glucanase, and the content of proteins and chlorophyll, were also investigated. For the *in vitro* and greenhouse experiments the culture filtrate of *P. sanguineus* at the concentrations of 1 to 20% was used, and water, acibenzolar-S-methyl (ASM: 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) and fungicide (azoxystrobin: 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) served as control treatments. In the *in vitro* study, culture filtrate did not inhibit mycelial growth, sporulation and conidia germination of *P. griseola*. The total area under the angular leaf spot progress curve was reduced by 82 and 49% respectively, for greenhouse and field experiments in relation to the water control. The activities of peroxidase and polyphenol oxidase, and the content of proteins and chlorophylls, increased in plants treated with the extract. The results from this study indicate the potential of *P. sanguineus* culture filtrate as an alternative control for angular leaf spot on beans.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, *Phaeoisariopsis griseola*, alternative control, pathogenesis related proteins.

## INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser afetada por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides. Com relação a parte aérea da planta, o hemibiotrófico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun [sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris] agente causal da mancha angular, representa um dos principais patógenos fúngicos, manifestando-se no caule, folhas e vagens da planta (Bianchini et al., 2005). Tradicionalmente o controle da mancha angular tem sido feito com o emprego de cultivares resistentes, sementes livres de patógenos e aplicação de fungicidas. Este último,

a curto prazo, tem suas vantagens mas a longo prazo pode causar problemas devido aos resíduos acumulados nos produtos e no ambiente (Ghini & Kimati, 2000) sendo necessário, desta forma, desenvolver métodos alternativos de controle de doenças, como a indução de resistência em plantas usando produtos naturais (Schwan-Estrada & Stangarlin, 2005).

A indução de resistência em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa em resposta ao tratamento com agentes eliciadores os quais são moléculas capazes de proteger contra infecções subseqüentes por patógenos (Stangarlin et al., 1999). Entre os eliciadores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas

medicinais e óleos essenciais (Schwan-Estrada et al., 2003; Schwan-Estrada & Stangarlin, 2005), bem como os extratos obtidos de cogumelos (Di Piero et al., 2005).

Entre os basidiomicetos com propriedades eliciadoras destaca-se *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., utilizado desde a medicina popular (Smânia et al., 1995) até ao controle alternativo de doenças de plantas (Assi, 2005; Beninca, 2007), com potencial para a indução de resistência quando se usa o extrato de seus basidiocarpos. Como não há relatos quanto ao cultivo e produção de corpos de frutificação de *P. sanguineus* em substrato, este trabalho optou por utilizar o filtrado de cultura deste basidiomiceto, evitando o extrativismo de seus basidiocarpos da natureza e considerando ainda o potencial que o filtrado de cultura de cogumelos possui para o controle de doenças. Komemushi et al. (1995) observaram atividade antimicrobiana sobre bactérias gram positivas, gram negativas, e sobre fungos quando usaram filtrado de cultura de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Posteriormente, foi isolado um composto antibacteriano formado por um álcool  $\beta$ -fenetil e lentinamicina, que estava presente em culturas líquidas do micélio (Komemushi et al., 1996). Este trabalho teve como objetivos investigar o potencial do filtrado de cultura de *P. sanguineus* no controle da mancha angular do feijoeiro, através de avaliações da atividade antimicrobiana *in vitro* contra *P. griseola* e da indução de resistência por meio da ativação das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase e da influência em alguns processos fisiológicos como o conteúdo de proteínas e clorofilas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e manutenção do patógeno

O isolado de *P. griseola* foi obtido a partir de lesões em folhas de feijoeiro naturalmente infectadas e cultivado em meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de  $\text{CaCO}_3$  + 800 mL de água destilada), por 14 dias a temperatura de 24°C com escotofase total (Stangarlin et al., 2000).

### Obtenção do filtrado de cultura de *P. sanguineus*

*P. sanguineus* foi cultivado em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA) e, posteriormente, repicado para meio líquido batata-dextrose (BD), contendo 20 g de dextrose em 1000 mL de caldo de batata (200 g de batata fresca/1000 mL de água destilada). Foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD, autoclavado a 120°C e 1 atm por 20 min. Cada frasco recebeu três discos (5 mm de diâmetro cada) de meio de cultura sólido, contendo micélio do fungo, obtidos de colônias com 14 dias de idade em BDA. Após a repicagem, os frascos foram mantidos sob agitação (150 rpm) na temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 h por 30 dias de incubação. Após esse período, as colônias foram filtradas separadamente e asépticamente em papel Whatman nº 41, obtendo-se dessa forma o filtrado bruto da cultura, o qual

foi mantido em geladeira a 4°C para posteriores diluições com água.

### Inibição da germinação de conídios por filtrado de cultura de *P. sanguineus*

Este teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (700  $\mu\text{L}$  por lâmina). Alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  das concentrações do filtrado, ajustadas para se obter as concentrações finais de 0, 1, 5, 10, 15 e 20%, esterilizados em autoclave ou filtradas em membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro) e alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  da suspensão de conídios de *P. griseola* ( $1 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24°C. Como controles, utilizaram-se fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) e o acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ). A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (Stangarlin et al., 1999).

### Inibição do crescimento micelial e da esporulação de *P. griseola*

O filtrado de cultura de *P. sanguineus* foi incorporado nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% em meio de cultura de suco de tomate. Os extratos foram esterilizados em autoclave e também por filtração em membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro). Utilizaram-se como tratamentos controles o fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) e o acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ). Para a repicagem de *P. griseola* nas placas de Petri contendo os tratamentos, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de conídios ( $1 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) de uma cultura com 14 dias de idade foi adicionada nas placas e distribuído na superfície do meio com alça de Drigalski. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 24°C com escotofase total. Foram avaliados o diâmetro e o número de colônias aos 14 dias após o início do experimento. Ao término do teste de inibição do crescimento micelial, avaliou-se a esporulação do fungo em cada placa. Para isto, preparou-se uma suspensão de conídios através da adição de 10 mL de água destilada por placa, raspagem da colônia, e filtragem em gaze, sendo determinado o número de conídios por mL em câmara de Neubauer ao microscópio.

### Experimento em casa de vegetação

Duas plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 5 L de uma mistura de solo e areia esterilizados (proporção 2:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, representando as repetições, dispostas em blocos casualizados. Para o teste de indução de resistência, utilizaram-se os tratamentos com extratos aquosos de filtrado de cultura de *P. sanguineus* nas concentrações de 10 e 20%, e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) e o acibenzolar-

S-metil (75 mg i.a. L<sup>-1</sup>). Os extratos e os controles foram aplicados por aspersão na 3ª folha (estádio vegetativo V4), em quantidades de 3 mL por folha.

### Experimento a campo

O experimento constituiu-se de três blocos casualizados, sendo que cada bloco era composto por cinco parcelas, e cada parcela representava um tratamento. Cada parcela tinha três linhas de 3 m de comprimento, espaçadas 0,5 m entre si, com dez plantas (IAPAR 81 – Carioca) por metro linear. A linha central, descontando-se 0,5 m da bordadura anterior e posterior, foi considerada como área útil para avaliação. Foram aplicados 400 kg ha<sup>-1</sup> de NPK (04-14-08) no sulco da sementeira e os demais tratamentos culturais como capinas foram realizados sempre que necessário. Para o teste de indução de resistência a campo, utilizaram-se os tratamentos com filtrado de cultura de *P. sanguineus*, nas concentrações 10 e 20%, além dos controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e o acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L<sup>-1</sup>). Os extratos e os controles foram aplicados por aspersão em toda a planta (1000 L ha<sup>-1</sup>), divididas em duas aplicações: a primeira na fase vegetativa (V3) e a segunda na fase reprodutiva (R3).

### Inoculação do patógeno

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL<sup>-1</sup>), sendo a concentração ajustada para 4x10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. A inoculação em casa de vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos e dos controles, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara-úmida e no escuro, à temperatura ambiente por 48 h e, posteriormente, mantidas em casa de vegetação, segundo metodologia utilizada por Stangarlin et al. (2000). No campo, foram realizadas duas inoculações, a primeira na fase vegetativa (V3) e a segunda na fase reprodutiva (R3), ambas três dias após pulverização dos extratos e dos controles.

### Avaliação da severidade

A severidade da mancha angular em casa de vegetação foi avaliada nas 3ª e 4ª folhas aos 8, 12, 16, 20 e 24 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática elaborada por Godoy et al. (1997). A campo, as avaliações iniciaram-se quando surgiu o primeiro sintoma da doença (sete dias após a inoculação), obtendo-se cinco avaliações a cada quatro dias, da porção mediana inferior das plantas. Após a segunda pulverização dos extratos e dos controles, a severidade foi avaliada da mesma forma que na primeira aplicação, porém avaliando-se apenas a porção mediana superior do dossel das plantas. Com as avaliações de severidade da doença, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da mancha angular (AACPM) por meio de equação proposta por Shaner & Finney (1977).

### Coleta de amostras para análises bioquímicas

Discos de folha com 3,46 cm<sup>2</sup> (três discos/folha) foram coletados as 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação e também quando do aparecimento dos sintomas (144 h). Durante o procedimento, cada amostra (três discos) coletada foi imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20°C. Coletaram-se três amostras (repetições) nas 3ªs folhas trifoliadas inoculadas, bem como nas 4ªs folhas trifoliadas não-inoculadas (Stangarlin & Pascholati, 2000).

### Obtenção dos extratos protéicos

As amostras de folhas foram homogeneizadas mecanicamente em 2 mL de tampão de extração fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) em almofariz de porcelana. O homogenato foi centrifugado a 6.500 g durante 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para posterior determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase, β-1,3-glucanase e conteúdo protéico.

### Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C, pelo método espectrofotométrico direto a 470 nm durante 2,15 min (Lusso & Pascholati, 1999). A atividade da peroxidase foi expressa em absorbância min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de tecido fresco.

### Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). Os resultados foram expressos em absorbância min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido fresco.

### Atividade de β-1,3 glucanase

A atividade de β-1,3 glucanase foi avaliada segundo metodologia descrita por Stangarlin et al. (2000). A reação foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e os resultados expressos em µg de glicose min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido fresco.

### Teor de proteína

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas, expressa em termos equivalentes de µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL<sup>-1</sup>), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL<sup>-1</sup>.

### Teor de clorofila

Para a quantificação da clorofila foi utilizada a metodologia adaptada de Arnon (1949). As amostras de tecido vegetal (0,1 g) foram acondicionadas em frascos de vidro com 10 mL de acetona 80%, durante 7 dias no

escuro a 25 °C. Após esse período realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 663 nm e 645 nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A concentração de clorofila *a* foi obtida pela fórmula  $(0,0127.A_{663}) - (0,00269.A_{645})$  e para clorofila *b* pela fórmula  $(0,0229.A_{645}) - (0,00468.A_{663})$  (Arnon, 1949). O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b*. Os valores foram expressos em mg g<sup>-1</sup> tecido fresco.

### Análise estatística

A análise de variância foi realizada através do programa estatístico JMP (Statistical Analysis System SAS Institute Inc. EUA, 1989 – 2000 versão 4.0.0.), e a comparação das médias dos tratamentos com os controles foi realizada pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade antimicrobiana

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de filtrado de cultura de *P. sanguineus* sobre a germinação de esporos, crescimento micelial e esporulação de *P. griseola* não apresentaram diferença estatística significativa (dados não mostrados). Esses resultados são satisfatórios, considerando que na compreensão de Sticher et al. (1997), para um produto ser considerado indutor de resistência, este não deve exibir atividade antimicrobiana *in vitro* ou *in vivo*.

### Controle da mancha angular em casa de vegetação e campo

De acordo com a área abaixo da curva do progresso da mancha angular (AACPMA), verificou-se que nas plantas tratadas com o filtrado de cultura de *P. sanguineus* houve reduções em média na AACPMA de 82 e 49% em

casa de vegetação e a campo, respectivamente, em relação ao tratamento com água (Tabela 1). Em casa de vegetação, para a 3ª folha, tratada e inoculada, a redução foi de 78% em média, enquanto que na 4ª folha, apenas inoculada, a redução foi de 65%. Esses dados, juntamente com a ausência de atividade antimicrobiana *in vitro*, indicam o efeito indutor de resistência local e sistêmico do filtrado de cultura de *P. sanguineus*. Em campo, para a porção mediana inferior não houve diferença estatística das plantas tratadas com água ou com ASM, enquanto que na porção mediana superior, o filtrado diferiu dos tratamentos com água e ASM, com AACPMA inferiores a estes.

Assi (2005) obteve resultados semelhantes com extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*, reduzindo a severidade da antracnose em feijoeiro de forma sistêmica. Di Piero & Pascholati (2004) demonstraram redução parcial na severidade da antracnose em folhas de pepino pré-tratadas com os extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*. O efeito protetor foi dependente da concentração do extrato utilizado e, em menor grau, do intervalo de tempo entre a indução e a inoculação.

### Atividade de peroxidase

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 a sistemicidade do efeito (Figura 1). O filtrado induziu a atividade aos 4 dias após a inoculação (DAI), para a concentração a 10%, comparado a água e fungicida, reduzindo posteriormente aos 5 e 7 DAI. O filtrado a 20% inibiu parcialmente a atividade de peroxidase aos 5 e 7 DAI em relação aos controles ASM e fungicida e ASM, respectivamente. Efeito semelhante foi observado na 4ª

**TABELA 1** - Área abaixo da curva de progresso da mancha angular (AACPMA) em feijoeiro em função dos tratamentos com filtrado de cultura de *P. sanguineus* e os controles água, fungicida e ASM em condições de casa de vegetação e campo

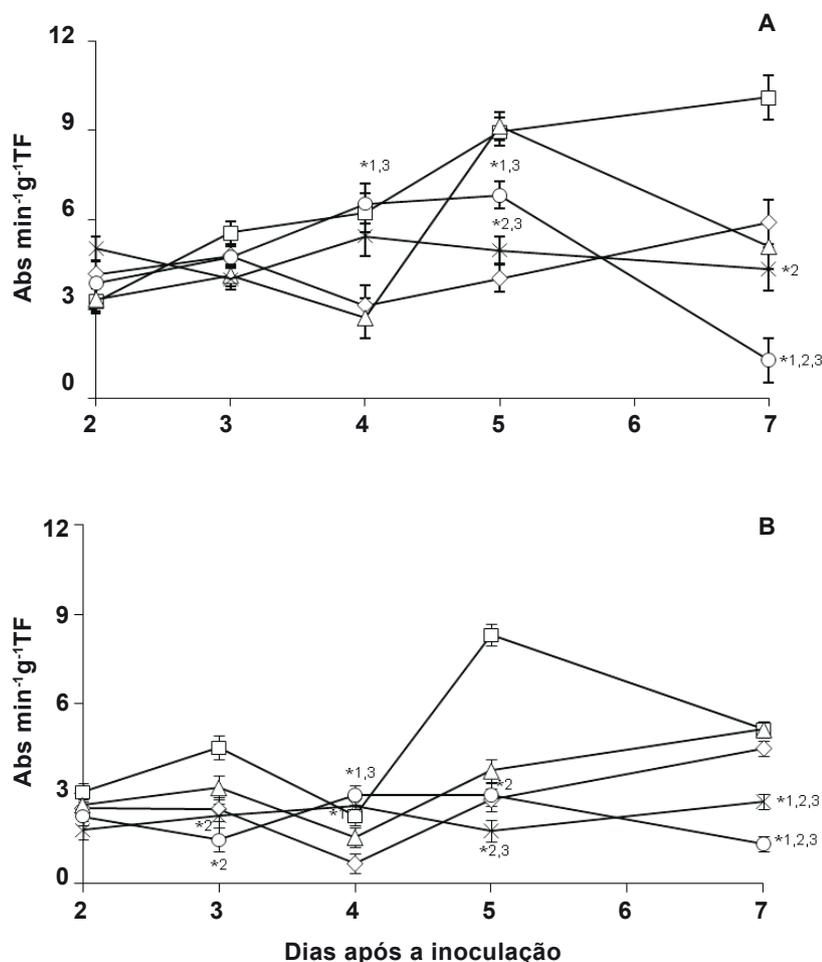
Tratamentos	AACPMA			
	Casa de vegetação		Campo	
	3ª folha	4ª folha	P.M.I <sup>***</sup>	P.M.S <sup>***</sup>
Filtrado de cultura 10%	7,4 <sup>1</sup>	2,5 <sup>1</sup>	48 <sup>3</sup>	48,7 <sup>1,2,3</sup>
Filtrado de cultura 20%	10,8 <sup>1</sup>	3,6 <sup>1</sup>	48,4 <sup>3</sup>	45,2 <sup>1,2,3</sup>
Água	41,9	8,8	59,4	89
ASM*	2,3	5,2	41,9	67,7
Fungicida**	6,7	2,4	6,3	16,1
C.V.	31	7,3	47,5	53,9

Médias na coluna seguida de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e fungicida (3). Para análise estatística os dados foram transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$

\*ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L<sup>-1</sup>)

\*\*Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L<sup>-1</sup>)

\*\*\*P.M.I e P.M.S: Porção mediana inferior e superior da planta, respectivamente.



**FIGURA 1** - Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após a aplicação de (◇) água, (□) acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e (Δ) fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e os extratos aquosos do filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* a 10% e 20% (○ e ×). A e B representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. Número seguido de (\*) indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett quando comparada aos controles (1) água, (2) ASM e (3) fungicida. TF: tecido fresco.

folha não tratada, indicando um provável efeito indutor sistêmico.

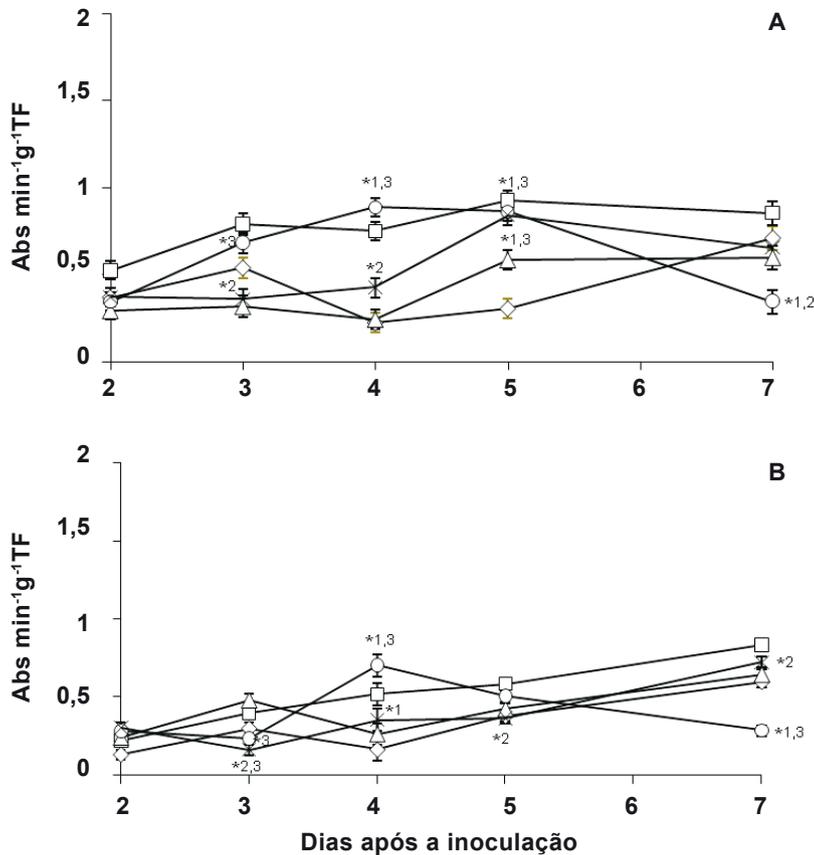
Mudanças na atividade das peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicíclicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina. Esse polímero, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores funciona como uma barreira física à penetração do patógeno (Cavalcanti et al., 2005).

Assi (2005) verificou ativação de peroxidase em feijoeiro tratado com extrato aquoso de *P. sanguineus* e desafiado com *Colletotrichum lindemuthianum*, tanto local como sistemicamente, concordando com os resultados obtidos nesse trabalho. Beninca (2007) avaliou o efeito de extratos orgânicos de basidiocarpos de *P. sanguineus* e verificou que o extrato diclorometanólico para sorgo e soja e etanólico para soja, inibem a atividade de peroxidase, enquanto que o extrato hexânico promove a atividade para sorgo e a atividade específica para soja. Para Kuhn (2007),

a atividade de peroxidase em feijoeiro foi influenciada em função do tempo, do número de aplicações e do indutor. O indutor ASM promoveu aumento da atividade de forma mais acentuada e mais rápida que o indutor biótico *Bacillus cereus*.

#### Atividade de polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase foi influenciada pelos tratamentos com filtrado de cultura de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito (Figura 2). Estes resultados diferem daqueles encontrados por Meinerz et al. (2007), onde a atividade da polifenoloxidase não diferiu do tratamento com água, havendo inclusive decréscimo da atividade com o aumento da concentração do extrato de basidiocarpo de *P. sanguineus*. Da mesma forma, Baldo (2008) não verificou incrementos significativos na atividade dessa enzima em feijoeiro tratado com extrato de *P. sanguineus* e inoculado com *C. lindemuthianum*. Kuhn (2007) observou que a atividade da polifenoloxidase em feijoeiro não foi alterada em função dos indutores *Bacillus cereus* e ASM, enquanto que Itako et al. (2008) observaram



incremento na atividade dessa enzima em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e inoculadas com *Alternaria solani*.

#### Atividade de β-1,3 glucanase

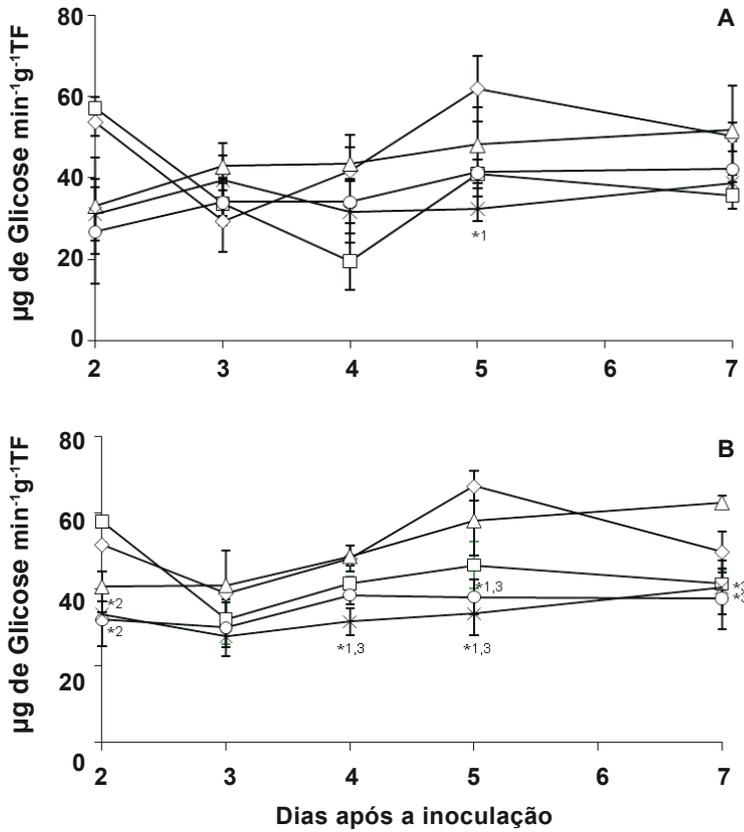
A atividade da β-1,3 glucanase foi influenciada pelos tratamentos com filtrado de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada (Figura 3). A concentração a 10% não apresentou efeito significativo na 3ª folha e a 20% foi menor que o tratamento com água aos 5 DAI. Comportamento semelhante foi observado na 4ª folha, porém de forma mais acentuada. Baldo (2008) verificou incremento na atividade específica de β-1,3 glucanase em feijoeiro tratado com extrato de *P. sanguineus* e desafiado com *C. lindemuthianum*. Na 1ª folha, tratada e inoculada, houve incremento de 28% na atividade, enquanto que na 2ª folha, não tratada, mas inoculada, o filtrado de cultura a 5% e o extrato de micélio a 10% incrementaram em 331 e 1057%, respectivamente, a atividade dessa enzima.

Extratos de outros basidiomicetos também têm induzido a atividade de β-1,3 glucanase. Fiori-Suzuki et al. (2008) verificaram aumento na atividade dessa enzima em maracujazeiro inoculado com *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora* e tratados com extratos de *L. edodes* e *A. blazei* nas concentrações de 20 e 40%. De acordo com

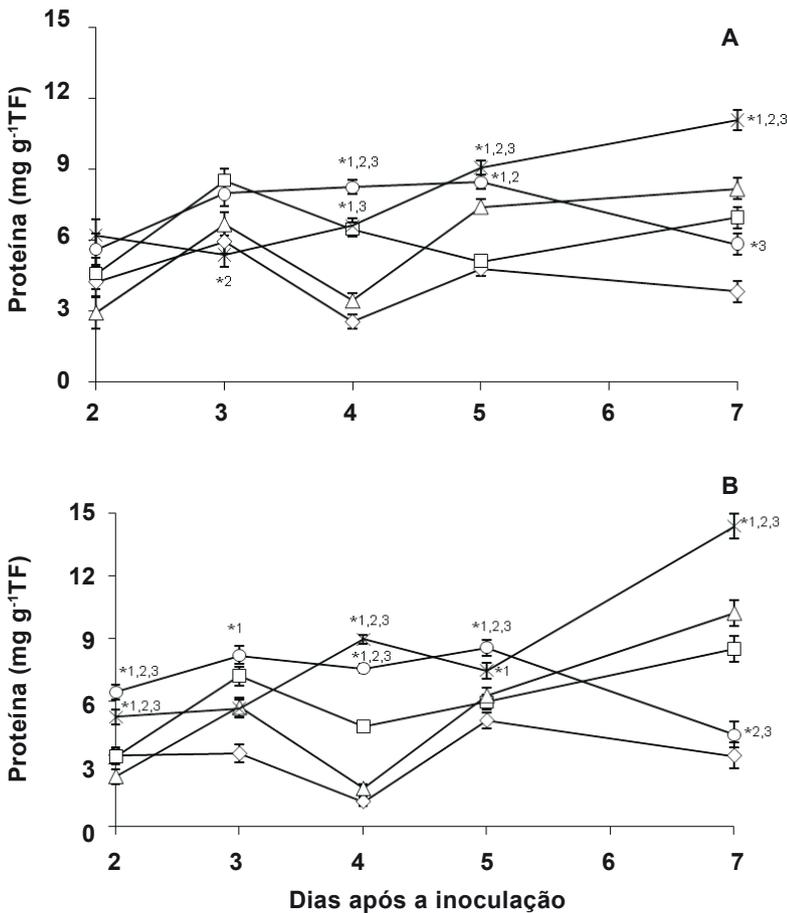
Stangarlin et al. (2000), plantas de feijoeiro desafiadas com *P. griseola* não apresentaram alteração na atividade de β-1,3 glucanase, ao passo que, quando desafiadas com *Uromyces appendiculatus*, a indução da atividade dessa enzima ocorreu (Stangarlin & Pascholati, 2000). Dessa forma, supõe-se que exista uma relação entre o tratamento eliciador e o patógeno desafiante na ativação dos mecanismos de defesa em plantas. A planta poderia investir na produção de compostos que normalmente seriam produzidos na presença do patógeno, porém, com maior eficiência quando pré-disposta a um eliciador.

#### Teor de proteína

O teor de proteína foi significativamente alterado tanto na folha tratada como na folha não tratada com os filtrados de *P. sanguineus*. Na 3ª folha, o teor de proteína no tratamento filtrado de cultura a 10% foi superior aos três tratamentos controles aos 4 DAI, aos 5 DAI maior que a água e ao ASM e aos 7 DAI superior apenas ao fungicida. No extrato a 20% foi inferior aos 3 DAI em relação ao ASM, com posterior aumento aos 4 DAI comparado com a água e o fungicida e aos três controles aos 5 e 7 DAI. Na 4ª folha verificou-se semelhante efeito (Figura 4). O conteúdo de proteínas no tecido vegetal desafiado com um patógeno ou tratado com eliciador pode indicar a ativação dos



**FIGURA3**-Atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após a aplicação de (◇) água, (□) acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e (Δ) fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e o filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* a 10% e 20% (○ e ×). A e B representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. Número seguido de (\*) indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett quando comparada aos controles (1) água, (2) ASM e (3) fungicida. TF: tecido fresco.

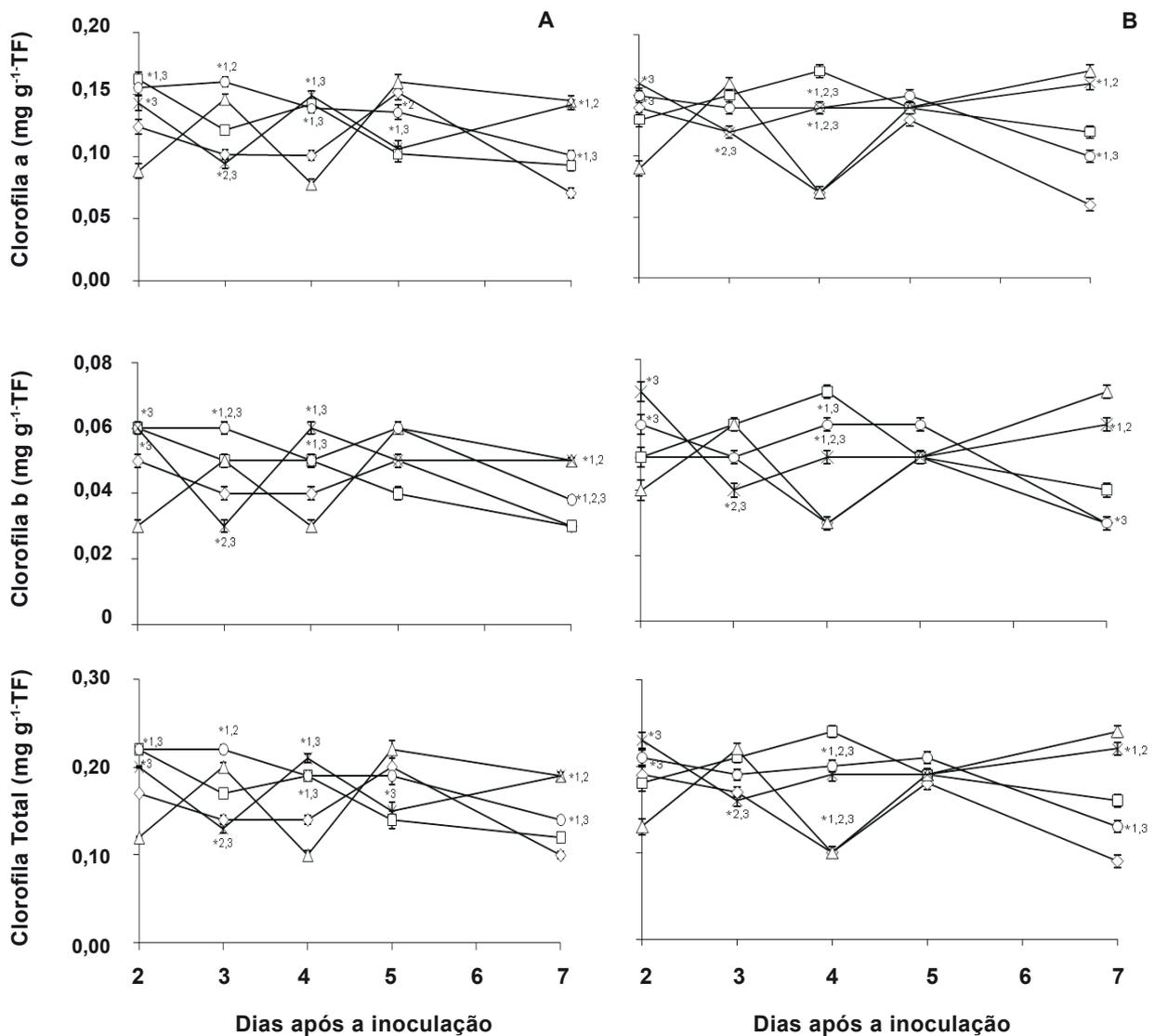


**FIGURA4**- Teor de proteína em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após a aplicação de (◇) água, (□) acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e (Δ) fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e o filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* a 10% e 20% (○ e ×). A e B representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. Número seguido de (\*) indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett quando comparada aos controles (1) água, (2) ASM e (3) fungicida. TF: tecido fresco.

mecanismos de defesa. Entre as proteínas, há as relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), as quais são induzidas nos tecidos vegetais em função da inoculação com patógenos/microrganismos, sistemicamente ou em parte 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 ASM, demonstrando a especificidade na resposta fisiológica deste hospedeiro ao tratamento eliciador.

### Teor de clorofila

O conteúdo de clorofila *a*, *b* e total em plantas de feijoeiro tratadas com filtrado de *P. sanguineus* e desafiadas com *P. griseola* apresentou alterações estatisticamente significativas (Figura 5). O filtrado de cultura a 10% aumentou o conteúdo de clorofila em relação à água aos 2, 3, 4 e 7 DAI, ao ASM aos 3 DAI e ao fungicida aos 2 e 4 DAI e diminuiu quando comparado ao fungicida aos 7 DAI. O filtrado de cultura a 20% apresentou maior teor de clorofila em relação a água (4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI), porém menores teores



**FIGURA 5** - Teor de clorofila *a*, *b* e total em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após a aplicação de (◇) água, (□) acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e (△) fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L<sup>-1</sup>) e o filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* a 10% e 20% (○ e ×). A e B representam respectivamente a 3<sup>a</sup> folha tratada e inoculada e a 4<sup>a</sup> folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. Número seguido de (\*) indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett quando comparada aos controles (1) água, (2) ASM e (3) fungicida. TF: tecido fresco.

são observados em relação ao ASM e ao fungicida aos 3 DAI e apenas ao ASM 5 dias após a inoculação. Verifica-se um comportamento semelhante dos dados na 4ª folha não tratada, ressaltando o efeito sistêmico de *P. sanguineus* sobre o conteúdo de clorofila total em feijoeiro.

Esses resultados sugerem a necessidade de produção de energia para síntese dos compostos de defesa da planta, considerando-se que as moléculas de clorofila *a* e *b* constituem os dois sistemas de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante (Ferri, 2004). Stangarlin & Pascholati (2000) verificaram incremento no teor de clorofila em regiões infectadas com *U. appendiculatus*, o que ocorre tanto na cultivar de feijoeiro moderadamente suscetível como altamente suscetível. Quando as mesmas cultivares foram infectadas com *Phaeoisariopsis griseola*, observaram-se reduções nos teores de clorofila *a* e *b* na cultivar moderadamente suscetível, ao passo que não houve diferença significativa na cultivar altamente suscetível quando comparada ao controle.

Diante dos resultados aqui apresentados pode-se concluir que os extratos obtidos do filtrado de cultura de *P. sanguineus* reduziram a severidade da mancha angular do feijoeiro, tanto local como sistemicamente, por meio do aumento da atividade de enzimas de defesa como peroxidase e polifenoloxidase. Alterações fisiológicas como o teor de proteínas e clorofilas foram incrementadas nas plantas de feijoeiro tratadas com os extratos, indicando a eficiência destes em reduzir a doença.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária e à Financiadora de Projetos e Estudos - FINEP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho. JRS e KRFSE agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15.
- Assi L (2005) Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Marechal Cândido Rondon PR.
- Baldo M (2008) Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, Marechal Cândido Rondon PR.
- Beninca CP (2007) Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos

de *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Marechal Cândido Rondon PR.

Bianchini A, Maringoni AC, Carneiro SMTPG (2005) Doenças do feijoeiro. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. 4ª edição. São Paulo SP. pp. 333-349.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Cavalcanti LS, Brunelli KR, Stangarlin JR (2005) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende, MLV, Romeiro RS (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. pp. 81-124.

Di Piero MR, Pascholati SF (2004) Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. *Summa Phytopathologica* 30:243-250.

Di Piero RM, Garcia Junior D, Tonucci NM (2005) Indutores bióticos. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. pp. 29-50.

Duangmal K, Apenten RKO (1999) A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. romano). *Food Chemistry* 64:351-359.

Ferri MG (2004) Fisiologia Vegetal. São Paulo SP. Editora Pedagógica e Universitária.

Fiori-Suzuki CCL, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Itako AT, Tolentino Junior JB (2008) Ativação da enzima glucanase em folhas de maracujazeiro tratados com extratos de cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. *Summa Phytopathologica* 34 (Supl.):104-105.

Ghini R, Kimati H (2000) Resistência de Fungos a Fungicidas. Jaguariúna SP. Embrapa Meio Ambiente.

Godoy CV, Carneiro SMTPG, Iamauti MT, Dalla Pria M, Amorim L, Berger RD, Bergamin Filho A (1997) Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 104:336-345.

Guzzo SD (2003) Proteínas Relacionadas à Patogênese. Revisão Anual de Patologia de Plantas 11:283-332.

Itako AT, Tolentino Junior JB, Schwan-Strada KRF, Balbi-Peña MI (2008) Polifenoloxidase induzida por óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em folhas de tomate inoculadas com *Alternaria solani*. *Summa Phytopathologica* 34 (Supl.):54.

Komemushi S, Yamamoto Y, Fujita T (1995) Antimicrobial substance produced by *Lentinula edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 23:81-86.

Komemushi S, Yamamoto Y, Fujita T (1996) Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinula edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 24:21-25.

Kuhn OJ (2007) Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, ESALQ. Piracicaba SP.

- Larcher W (2000) *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos SP. Editora Rima Artes e Textos. pp. 408-465.
- Lusso MFG, Pascholati SF (1999) Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica* 25:244-249.
- Meinerz CC, Baldo M, Franzener G, Iurkiv L, Braga CL, Kuhn OJ, Stangarlin JR (2007) Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *P. sanguineus*. *Fitopatologia Brasileira* 32 (Supl.):304.
- Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR (2005) Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (Eds.) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba. FEALQ. pp. 125-138.
- Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Cruz MES (2003) Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira* 8:54-56.
- Shaner G, Finney R (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox Wheat. *Journal of Phytopathology* 67:1051-1056.
- Smânia A, Monache FD, Smania EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS (1995) Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Ethnopharmacology* 45:177-181.
- Stangarlin JR, Schwan-Estrada KRF, Cruz MES, Nozaki MH (1999) Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. *Biocologia Ciência & Desenvolvimento* 11:16-24.
- Stangarlin JR, Pascholati SF, Labate CA (2000) Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. *Fitopatologia Brasileira* 25:59-66.
- Stangarlin JR, Pascholati SF (2000) Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase,  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. *Summa Phytopathologica* 26:34-42.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP (1997) Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.

---

Recebido 2 Setembro 2008 - Aceito 30 Março 2009 - TPP 8108  
Editor Associado: Mario Lucio V. de Resende