

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

**EFEITOS DOS INDUTORES DE RESISTÊNCIA
(GOMA XANTANA E ALICINA)
NA SUPERFÍCIE FOLIAR DE FOLHAS DE CEVADA
INFECTADAS COM
*Bipolaris sorokiniana***

MOGI DAS CRUZES

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

**EFEITOS DOS INDUTORES DE RESISTÊNCIA
(GOMA XANTANA E ALICINA)
NA SUPERFÍCIE FOLIAR DE FOLHAS DE CEVADA
INFECTADAS COM
*Bipolaris sorokiniana***

Dissertação apresentada à Universidade de Mogi das Cruzes para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dra. Erna Elisabeth Bach

MOGI DAS CRUZES

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Herman, Carlos César

Efeitos dos indutores de resistência (goma xantana e alicina) na superfície foliar de folhas de cevada infectadas com *Bipolaris sorokiniana* / Carlos César Herman. – 2006.

74 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Erna Elisabeth Bach

1. Indução de resistência 2. *Bipolaris sorokiniana* 3.
Cevada – doenças e pragas 4. Controle biológico I.
Título II. Bach, Erna Elisabeth

CDD 632.96

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e cinco de agosto de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Biotecnologia na interação cevada-indutor - *Bipolaris sorokiniana*: Análise Citológica" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Carlos Cesar Herman**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Erna E. Bach e Wellington Luiz de Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Joana D'Arc Felício do Instituto Biológico, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

Mogi das Cruzes, 25 de agosto de 2006

Comissão Examinadora

Julgamento

Erna E. Bach
Prof.ª Dr.ª Erna E. Bach

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

Wellington Luiz de Araújo
Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

Joana D'Arc Felício
Prof.ª Dr.ª Joana D'Arc Felício

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

DEDICO

Ao CRIADOR pela oportunidade que me foi dada, à minha orientadora pela ajuda e ensinamentos, à minha esposa Rosângela e minha filha Graziela pelo incentivo e paciência aos meus familiares que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Erna Elisabeth Bach pela orientação, amizade e paciência dispensados durante o trabalho, à Professora Dra Eliana Rodrigues, Diretora do departamento de Ciências da Saúde, UNINOVE, por ter permitido a realização deste trabalho.

A Cooperativa de Guarapuava, Paraná, em especial a Noemir Antoniazzi pelo fornecimento das sementes.

A UMC pela oportunidade da realização do mestrado e a FAEP (Fundação de Amparo ao Ensino e a Pesquisa) pela bolsa concedida.

Aos Professores da Universidade de Mogi das Cruzes, que muito me incentivaram no curso de pós-graduação.

Aos Professores da Uninove em especial ao Ms. André P. C. Carvalho, e Dr. Armando Serra, que muito contribuíram para minha formação acadêmica

Aos amigos, Alerrandro Carvalho e Taís Felipe pela amizade e ajuda, sem a qual o caminho seria mais difícil.

A UNINOVE, Departamento da Saúde, que possibilitou esta jornada e em especial a Maria Fernanda A. Broglio, e ao amigo Carlos Eduardo Moscato Fuzaro pela compreensão sobre as dificuldades deste trabalho, à Andréia Alves de Oliveira pela compreensão e atenção.

A todos os colegas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meu pai Carlos E. Herman, minha mãe Sueli Cabreira, minha esposa Rosângela M. A. Herman e minha filha Graziela R. A. Herman pela paciência que tiveram para que eu terminasse este trabalho

Ao Criador por permitir a realização deste trabalho.

“Educai as crianças e não será preciso castigar os homens.”

Pitágoras de Samos (571-497a. C.).

“Somente a ciência pode resolver os problemas da fome e da pobreza, da higiene pública e do analfabetismo, da superstição e de costumes arraigados, dos vastos recursos que estão sendo desperdiçados, de um país rico habitado por pessoas famintas... Quem de fato poderia se dar ao luxo de ignorar a Ciência? A cada passo teremos que procurar a sua ajuda... O futuro pertence à Ciência e àqueles que com ela formam amizade.”

Jawaharl Nehru (1889- 1964 d. C.)

In: Procedimentos do Instituto Nacional de Ciências da Índia, 1961



RESUMO

O fungo *Bipolaris sorokiniana* causador da mancha foliar em cevada, tem causado prejuízos aos produtores e às indústrias cervejeiras. Para o controle destes agentes, o tratamento mais utilizado pelos produtores é a utilização de fungicidas, podendo provocar riscos para o meio ambiente e para a saúde do homem. Visando eliminar estes inconvenientes, um dos métodos preconizados foi o do uso de indutores de resistência. Os elicitores utilizados foram a goma xantana e alicina, identificadas como sendo um indutores de resistência local e sistêmica em plantas de cevada. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar perante a microscopia óptica a influência exercida pelos elicitores (goma xantana e alicina) sobre o desenvolvimento do patógeno bem como observar seus efeitos na interação planta-patógeno. Para isto, plantas de cevada de duas cultivares (Embrapa 128 e Embrapa BRS 195) foram submetidas aos tratamentos com os indutores e após o período de 4 e 7 dias, as folhas foram retiradas, clarificadas, coradas e avaliadas perante a microscopia. Os resultados indicaram que a ultraestrutura de folhas sadias permaneceram idênticas nas duas cultivares, enquanto que nas folhas infectadas, ocorreu germinação bipolar do fungo, vários apressórios e pontos de penetração. As folhas submetidas aos tratamentos com indutores, nas duas cultivares, apresentaram indução de resistência demonstrada através da microscopia onde pode-se observar que os conídios germinaram, formando apressórios e penetração. Isto veio indicar que os elicitores goma xantana e alicina foram eficientes na indução de resistência demonstrando na superfície foliar nenhuma ação inibitória no crescimento fúngico, mas sim que algum sinal dentro da planta foi formado impedindo o desenvolvimento do fungo traduzindo-se assim em resistência.

Palavras chaves: citologia, indutores, indução de resistência, *Bipolaris sorokiniana*, Cevada, mancha marrom.

ABSTRACT

Barley plants when are attacked by *Bipolaris sorokiniana* causes foliar spot blotch and present great loss to the culter and beer industry. In order to control it treatment with fungicides has been used, and can being possible risks to the environment and to the human health. Aiming to eliminate these inconvenient situations, one of the process has used of elicitors as method for alternative control. The elicitors used in the work was xanthm gum and alicin and was identified as inducer of resistance in barley plants locally and sistemically. Like this, theobjective of the present work was to evaluate before the optical microscopic the inflence exercised by the elicitors (xantham gum and alicin) on the development of the patogen as well as to observe the interaction plant-pahogen. For this, barley plants variety Embrapa 128 na Embrapa BRS 195, were submitted to treatemnts with inducers and after four and seven days, the leafs were excised, clarified and evaluatein microscopy. The results indicated that structure of healthy leaves were the same in the two varieties and in infewcted leaves], was observed the conidia with bipolar germination and various appressoria na d penetration points. The leaves when treated with inducers, intwo varieties, demonstrated induction of protection and throught microscopy was observed that conidia was germanted with appressoria and penetration points. This came to demonstrated that ekicitors xantham gum and alicin have not inhibitory effect in foliar surface but, have a signal formed in the plant that have prevent and stop the development of fungi and so the plant can be defense form fungi.

Keywords: cytology, inducers, induction of resistance, *Bipolaris sorokiniana*, Barley, brown spot.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Cultivar e tratamentos que foram submetidas plantas de cevada..	34
Tabela 2 Características do fungo <i>Bipolaris</i>	37
Tabela 3 Desenvolvimento do isolado de <i>Bipolaris sorokiniana</i> no meio de cultura.....	46
Tabela 4 Desenvolvimento do isolado de <i>Bipolaris sorokiniana</i> no meio de cultura.....	47
Tabela 5 Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada cultivar Embrapa 128 e Embrapa BRS 195 contra <i>Bipolaris sorokiniana</i> , utilizando goma xantana como indutor.....	48
Tabela 6 Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada cultivar Embrapa 128 em Embrapa BRS 195 contra <i>Bipolaris sorokiniana</i> , utilizando alicina como indutor.....	52
Tabela 7 Número de conídios germinados, não germinados, número de hifas e pontos de penetração de conídios de <i>Bipolaris sorokiniana</i> em folhas de cevada Embrapa 128 e Embrapa BRS 195.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Morfologia da planta de cevada.....	16
Figura 2 Escala de Feekes-Large.....	17
Figura 3 Desenho demonstrando ciclo primário e secundário.....	21
Figura 4 Conídio germinado penetrando diretamente na folha e estruturas associadas.....	21
Figura 5 Estrutura molecular da goma xantana.....	29
Figura 6 Aspecto visual das folhas de cevada infectadas das variedades 128 e 195.....	35
Figura 7 Folha de cevada Embrapa 128 sadia podendo visualizar estômatos, células bem como cloroplastos.....	36
Figura 8 Tubos germinativos fixados com ouro coloidal demonstrando o fluido como ECM (matriz extracelular) como adesão do fungo.....	38
Figura 9 Hifa fixada com ouro coloidal visto em microscopia eletrônica, sendo descolada da folha. Setas indicam o local da retirada.....	38
Figura 10 Pequenas manchas de cor azul indicando possível local onde o conídio estava aderido a folha 20 h após a inoculação.....	39
Figura 11 Aspecto do conídio com germinação bipolar, penetração diretamente na superfície com formação de apressório e de papila.....	40
Figura 12 Folha de cevada Embrapa 128 infectada com isolado de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	41
Figura 13 Foto mostrando conídio germinado com hifas e, apressório com ponto de penetração (seta) na cevada Embrapa 128.....	41
Figura 14 Conídio germinado bipolar mostrando alguns apressórios (a) e conídio não germinado (b).....	43
Figura 15 A foto mostra um conídio germinado e o caminho percorrido pela sua hifa, bem como a formação de apressórios na superfície foliar e, estômatos.....	44
Figura 16 Superfície foliar do cultivar EMBRAPA BRS 195 mostrando várias hifas.....	44
Figura 17 Conídio germinado bipolarmente mostrando apressórios e pontos de penetração em cultivar Embrapa BRS 195.....	45

Figura 18 Aspecto das folhas de cevada Cultivar Embrapa 128 tratadas com goma xantana.....	49
Figura 19 Aspecto das folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com goma xantana.....	50
Figura 20 Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa 128 tratadas com alicina.....	53
Figura 21 Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com alicina.....	54
Figura 22 Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com alicina (72h de intervalo de tempo).....	55
Figura 23 Número de conídios germinados, número de apressórios e % de proteção na cultivar Embrapa 128 quando tratadas com elicitor goma xantana (GX) ou alicina (Alic).....	57
Figura 24 Número de conídios germinados, número de apressórios e % de proteção na cultivar Embrapa BRS 195 quando tratadas com elicitor goma xantana (GX) ou alicina (Alic).....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 História da cevada e sua importância econômica	15
3.1.1 Planta de cevada.....	16
3.1.2 Melhoramento da planta de cevada.....	17
3.2 Pátogeno <i>Bipolaris sorokiniana</i>	19
3.3 Patogenicidade das plantas de cevada	19
3.4 Ciclos das relações patógeno-hospedeiro	20
3.5 Indução de resistência	26
3.5.1 Indutor goma xantana.....	29
3.5.2 Indutor alicina.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Preparação das plantas de cevada.....	31
4.2 Patógeno.....	31
4.3 Extração dos indutores.....	32
4.3.1 Goma xantana.....	32
4.3.1.2 Teste biológico.....	32
4.3.2 Alicina.....	32
4.3.2.1 Teste biológico.....	33
4.4 Indução de resistência.....	33
4.5 Coleta e clarificação das folhas.....	34
4.6 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Teste de patogenicidade.....	35
5.2 Aspecto estrutural da folhas de cevada sadias.....	36
5.3 Aspecto visual do fungo <i>Bipolaris sorokiniana</i>	36
5.4 Plantas infectadas dos cultivares EMBRAPA 128 e EMBRAPA BRS 195.....	40
5.5 Mecanismo da patogenicidade.....	45

5.6 Teste biológico dos indutores de resistência goma xantana e alicina	46
5.6.1. Goma xantana.....	46
5.6.2. Alicina.....	46
5.7. Indução de resistência com Goma xantana e alicina nos Cultivares Embrapa 128 e Embrapa BRS 195.....	47
5.7.1. Indução de resistência com Goma xantana no Cultivar Embrapa 128.....	
5.7.2. Indução de resistência com Goma xantana no Cultivar Embrapa BRS 195.....	47
5.7.3. Indução de resistência com Alicina no Cultivar Embrapa 128...	51
5.7.4. Indução de resistência com Alicina no Cultivar Embrapa BRS 195.....	51
5.8. OBSERVAÇÃO GERAL.....	57
6 CONCLUSÕES.....	58
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A cultura de cevada tem sido atacada por diferentes patógenos fúngicos tais como *Bipolaris sorokiniana*, *Blumeria graminis hordei*, *Puccinia hordei*, entre outros, causando prejuízos econômicos aos produtores bem como a indústria cervejeira, que podem chegar a 100% da produção. Os fungicidas utilizados para o controle dessas doenças, são prejudiciais à saúde dos seres humanos e ao meio ambiente. Visando diminuir o uso de fungicidas, tem sido estudado o uso de indutores de resistência no controle de doenças de plantas.

A indução de resistência pode ser definida como habilidade da planta em prevenir ou restringir o desenvolvimento e a conseqüente multiplicação do patógeno mediante o uso de elicitores, podendo o efeito ser local ou sistêmico. O mecanismo de defesa da planta deve se iniciar desde o reconhecimento do fungo pelo hospedeiro tanto quanto na penetração do fungo na planta podendo ser este controlado por diferentes fatores. Dentre os fatores estão incluídas as barreiras químicas e físicas que podem afetar a germinação do esporo tanto quanto na formação de apressório, o que pode ser constatado através de observações em microscopia óptica. No caso de elicitores, se estes não tiverem efeito sobre o fungo, devem estar penetrado na parede celular da folha, liberando algum sinal nas células para desencadear formação de compostos bioquímicos impedindo assim o desenvolvimento do mesmo.

A indução de resistência em plantas foi observada em casa-de-vegetação, tem-se como exemplo diferentes indutores como a goma xantana e a alicina atuando na interação trigo-*Bipolaris sorokiniana*, trigo-*Drechslera teres* e, em plantas de café, o indutor goma xantana contra *Hemileia vastatrix*.

2 OBJETIVOS

No presente trabalho procurou-se avaliar perante a microscopia óptica a influência exercida pelos elicitores (goma xantana e alicina) sobre o desenvolvimento do patógeno bem como observar o que ocorre na interação planta-patógeno.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 História da cevada e sua importância econômica

Provinda do Oriente Médio, a cevada foi cultivada na região chamada “Fertile Crescent” que abrangia a região da Jordânia, Turquia, Iraque, Irã, Israel e Síria. O nome científico da cevada é *Hordeum vulgare L.*, onde a forma cultivada teve origem na espécie selvagem *Hordeum spontaneum* pertencente agora à espécie *Hordeum vulgare sp. vulgare*, sendo uma monocotiledônea pertencente à família das gramíneas (RAVEN et al., 1996) .

Por sua adaptabilidade ecológica, suas sementes foram levadas à Etiópia, Grécia e China, daí atingindo grande parte do mundo (MINELLA, 2001).

A cevada possui grande rusticidade, existindo desde o início do século XX cultivos nos limites do Círculo Polar Ártico, nos Altiplanos do Tibet a 4.600m de altitude, em climas áridos como o do deserto do Saara ou nas planícies da Índia, coisa impossível a outros cereais (TONON, 1992).

O início do cultivo da cevada, no Brasil, ocorreu na época colonial, porém o processo de seleção iniciou-se em 1920 por intermédio de imigrantes europeus como os tcheco-eslovacos. Com a implantação do Plano Nacional de Auto-Suficiência em Cevada e Malte no Brasil, em 1976, a área de cultivo se expandiu, sendo a cevada incluída na política de preços mínimos ao crédito e financiamento à agricultores (MOURA, 1987).

O cultivo da cevada concentra-se nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e cultiva-se principalmente para fins cervejeiros (TONON, 1992). Nestes estados as características ecológicas são semelhantes pois segundo Almeida et al. (2003) constatou-se a presença de latossolos vermelhos nestes estados. As plantas de cevada desenvolvidas no latossolo vermelho, quando enriquecidos com matéria orgânica, apresentam o aspecto sadio e com verde intenso da clorofila, podendo ser causado pela presença do macronutriente fósforo, que possui o papel essencial por ser um componente de compostos fosfatados na célula, como por exemplo na formação do ATP que fornece energia para seu funcionamento. Almeida et al. (2003) ainda em seu estudo sobre latossolos vermelhos demonstraram que quanto menor a quantidade de matéria orgânica neste

tipo de solo, o fósforo se mostrou mais adsorvido aos óxidos de ferro que o compõe, evidenciando a importância da matéria orgânica para a biodisponibilidade da planta. As outras utilidades do grão de cevada são o malte, como ração para alimentação de animais e ainda matéria-prima para flocos e farinha na alimentação humana (MOURA, 1987; TONON, 1992).

No Brasil, no ano de 2003, a produção de cevada abrangeu uma área cultivada de 136 mil hectares, que em 2004 passou para 147 mil hectares, sendo esse aumento de área atribuído pelo pesquisador Euclides Minella, da Embrapa Trigo, ao vínculo do preço da cevada ao trigo. Em 2004, no estado de Goiás, deu-se início ao sistema de plantação irrigada, onde a safra ficou em torno de 4.700 quilos por hectare das cultivares BRS 180 e Embrapa BRS 195. Tanto no sequeiro como no irrigado, a preferência dos produtores foi pela cultivar Embrapa BRS 195 dada às características superiores de ampla adaptação, resistência ao acamamento, e sua alta produtividade. A Embrapa BRS 195 correspondeu por 60% da área plantada no Brasil. No Paraná (57 mil hectares), Rio Grande do Sul (88 mil hectares) foram plantadas lavouras de sequeiro, onde as mais plantadas foram as cultivares Embrapa BRS 195, Embrapa 127, 128, MN 698 e BRS 225 (MINELLA, 2004, MESQUITA, 2005).

3.1.1 Planta de cevada

A planta de cevada ou trigo crescendo no campo, desde o seu aparecimento no solo (germinação) até sua maturação quando seus grãos estão prontos para a colheita (Figura 1), apresenta diversas fases, o que é muito importante para saber a época certa, quando deve ser feita a aplicação dos fertilizantes em cobertura, dos defensivos e da irrigação da planta (LARGE, 1954)

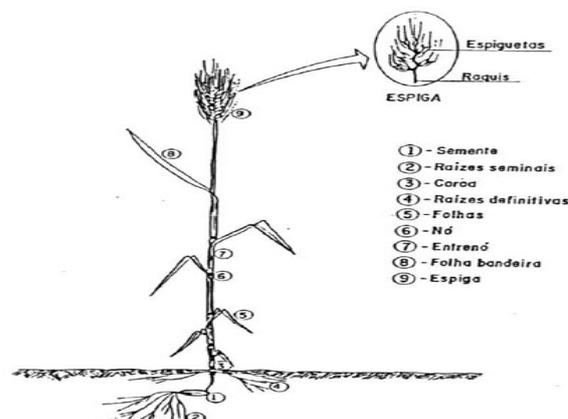
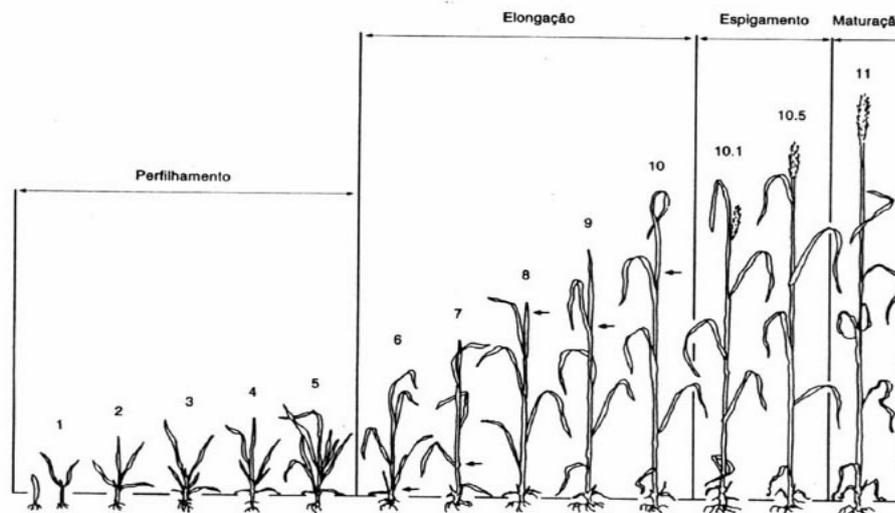


Figura 1. Morfologia da planta de cevada (LARGE, 1954)

O desenvolvimento do cereal foi esquematizado na escala de Feekes, sendo então modificada por Large (LARGE, 1954), subdividindo-a em estágios a fim de facilitar o estudo e aplicação (FIGURA 2).

Quando a semente de cevada é embebida, ela emite uma raiz seminal e subseqüentemente raízes laterais secundárias. O desenvolvimento do coleóptilo dá-se rompendo o solo acima da semente, emergindo de seu interior a primeira folha. Depois de duas a três semanas da emergência vão aparecer no primeiro nó acima da superfície do solo ramificações chamadas perfilhos, na fase do perfilhamento somente vemos na planta folhas e bainhas. Pseudocolmos são as bainhas que se assemelham aos colmos, pois os colmos verdadeiros estão ainda incipientes dentro das bainhas. Com o término do perfilhamento inicia-se ativo desenvolvimento com a alongação dos sentérios e das bainhas que os cobrem, dando início ao desenvolvimento da coluna, marcando assim o aparecimento do primeiro na base do vegetal.



Estádios	Descrição de cada estágio
1° ao 5°	Perfilhamento – germinação, nascimento das folhas.
6° ao 10°	Elongação – crescimento da planta e de suas folhas.
10.1° e 10.5°	Espigamento – surgimento das espigas.
11°	Maturação – onde a planta atinge sua maturação.

Figura 2: Escala Feekes-Large com a legenda indicando os estádios (LARGE, 1954).

Desenvolve-se o primórdio floral antes localizado na porção inferior da planta. No início da fase de crescimento da coluna ocorre a formação da espiga e esta se desloca para a parte interior do mesmo. Neste momento, externamente surge a última folha bandeira, desenvolve-se mais a espiga, distendendo-se e caracterizando o estágio chamado de emborrachamento. O espigamento é caracterizado pela emergência da espiga através da abertura da bainha, surge a espiga do perfilho principal, seguida das espigas dos demais perfilhos na ordem respectiva do aparecimento dos mesmos (LARGE, 1954, SILVA & MINELLA, 1996). Segundo Minella et al. (1996) a etapa mais problemática do desenvolvimento da cevada e doenças, no campo, refere-se ao estágio 5 em diante.

3.1.2 Melhoramento da planta de cevada

A Embrapa possui um programa de ênfase a resistência da cevada para controle de doenças, acamamento, maturação, emergência entre outras (ÁRIAS, 1995). Para os anos de 2005 e 2006 várias são as cultivares aprovadas para o plantio, dependendo do local e região. Dentre elas temos Embrapa BRS 195, Embrapa 128, Embrapa 127 etc.

Segundo a Embrapa-trigo (Indicações para plantio 2005-2006 fornecidas aos agricultores) a cultivar de cevada BRS 195 tem sido a melhor semente para a maltearia e a mais plantada na região sul do Brasil. As características desta cultivar são: ciclo de emergência de 92 dias, ciclo total para atingir a maturação de 135 dias, altura da planta atingida 65cm, sendo por este porte resistente ao acamamento quando se apresenta vento no campo. No caso de reação a doenças, a planta de cevada é suscetível a oídio, ferrugem da folha, giberela sendo moderadamente resistente a mancha reticular, mas altamente suscetível a mancha marron causada por *Bipolaris sorokiniana*.

Para a cultivar Embrapa 128, as características desta cultivar são ciclo de emergência de 87 dias, ciclo total para atingir a maturação de 133 dias, altura da planta atingida 90cm, sendo por este porte, alta e moderadamente resistente ao acamamento quando apresentar vento no campo. No caso de reação a doenças é suscetível a oídio, moderadamente resistente a ferrugem da folha e giberela sendo suscetível a mancha reticular e a mancha marron causada por *Bipolaris sorokiniana*.

Esta cultivar é aceita pelas qualidades de maltearia entretanto mais suscetível as doenças mais problemáticas no campo.

3.2 Patógeno *Bipolaris sorokiniana*

O patógeno da cevada *Bipolaris sorokiniana* foi descrito por (HUGHES, 1953), de acordo com a germinação dos conídios denominado de *Helminthosporium sativum*. Segundo Shoemaker (SHOEMAKER, 1959), foi proposta a separação dos fungos graminícolas, de acordo com a germinação dos conídios, que são de três tipos: *Bipolaris*, *Helminthosporium* e *Drechslera*. Já, em 1988, Muchovej et al (1988) propuseram o nome de *Bipolaris sorokiniana* ao patógeno da mancha foliar em cevada e confirmada por Alcorn (1988) onde o conídio observado ao microscópio apresenta as características: conídios curtos, elipsoidais e fusiformes escuros, com arredondamentos na ápice medindo cerca de 75 μm de comprimento, conidióforos usualmente sem ramificações e septos sem listras pretas.

Assim, o *Bipolaris sorokiniana* tem sido identificado como o agente casual da helmintosporiose da cevada sobrevivendo em sementes e restos de cultura de seu hospedeiro. Segundo Forcelini (1991), o fungo apresenta de 60% a 90% de transmissão, conseguindo sobreviver na semente de uma safra à outra, em diversas plantas que constituem-se em focos primários de doenças (REIS et al., 1988; OLIVEIRA & BAIER, 1993; SANTOS et al., 1996).

3.3 Patogenicidade de *Bipolaris sorokiniana* em cevada

O fungo *Bipolaris sorokiniana* tem sido o principal patógeno encontrado nas sementes de cevada e trigo sendo associado à podridão comum nas raízes e nas manchas foliares. Nas folhas, o fungo causa manchas foliares sendo descrita como mancha negra, marrom ou cinza causada por *Bipolaris sorokiniana*, onde sua fase sexuada é conhecida como *Cochliobolus sativus* (fase perfeita)(REIS et al, 1988).

Nas sementes de cevada, outros fungos podem também ser responsáveis pela podridão das raízes como *Drechslera teres* (Sacc) Shoem, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc) Shoem (REIS, 1987).

As condições climáticas de nosso país propiciam o desenvolvimento destes tipos de doenças (LUZ, 1982, MATHRE, 1985) causadas por fungos na cultura da cevada (VIEIRA, 1985) que leva à queda de produção e interfere na qualidade do malte produzido.

Nos anos de 1999/2000 foi feito um levantamento de revisão da atuação dos fungicidas no controle das doenças das partes aéreas da cevada cervejeira do Brasil. Segundo a conclusão de Picininni & Fernandes (2001) no ano de 1999 as condições climáticas ocorridas nas colheitas de inverno não favoreciam o aparecimento do fungo *Bipolaris sorokiniana*, não ocorrendo o mesmo no ano posterior, onde manchas foliares oriundas da atuação deste fungo, aliada ao oídio, foram doenças dominantes. As conclusões mostraram que fungicidas para controle do *Bipolaris sorokiniana* foram ineficazes.

Segundo Carmo et al. (2003) no trabalho com diferentes cultivares de cevada reagiram de maneira diferente à patogenicidade de diversos isolados de *Bipolaris sorokiniana*, demonstrando assim a presença de vários isolados do fungo apresentando diversas reações de patogenicidade sendo a maioria com reação de suscetibilidade.

Bach et al. (2003) relataram que isolados do mesmo fungo em trigo causaram manchas foliares em diferentes cultivares de cevada, tendo a capacidade de causar doenças em cevada e trigo sendo assim, os fungos demonstram uma especialização intra e interespecífica na patogenicidade de diferentes plantas e cultivares.

Turquetti et al. (2001) demonstraram que todas as cultivares brasileiras foram sensíveis ao fungo *Bipolaris sorokiniana* sendo assim, muito difícil encontrar variedade resistente a mancha foliar.

3.4 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro

O desenvolvimento de doenças infecciosas é caracterizado pela ocorrência de uma série de eventos que ocorrem em etapas sucessivas e ordenadas. Estes eventos incluem sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno. Todos os processos levam a um ciclo primário de infecção e depois ciclo secundário (FIGURA 3) (AMORIN, 1995 a, b).

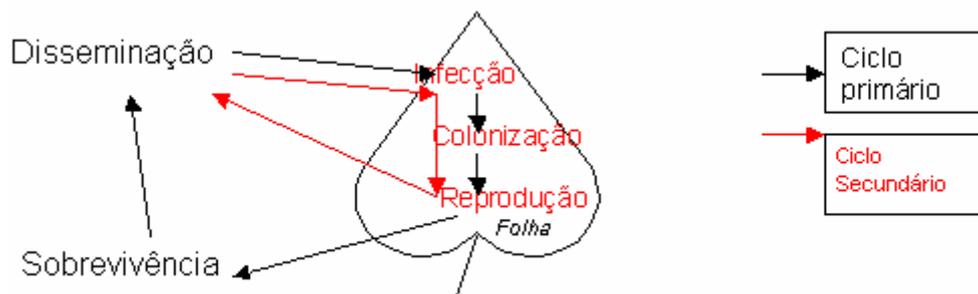


Figura 3 : Desenho demonstrando ciclo primário e secundário

No caso do fungo *Bipolaris sorokiniana* a sobrevivência ocorre em restos de cultura, enquanto a disseminação pode ocorrer pelos ventos, pela água, pelo homem e por insetos (AMORIN, 1995 c,d).

Para que ocorra a infecção se faz necessário primeiramente a adesão do conídio a superfície da planta hospedeira. Somente depois desta fase irá ocorrer a diferenciação do tubo germinativo em apressório e penetração na folha (LEITE et al., 1997). A adesão é considerada pré-requisito essencial durante a patogênese de fungos (MERCURE et al., 1994a,b, 1995). As etapas de atração e contato entre patógeno e o hospedeiro fazem parte das fases de reconhecimento da interação (LEITE et al., 1997). Durante a pré-penetração, ocorre a adesão através da liberação de materiais adesivos produzidos pelo patógeno.

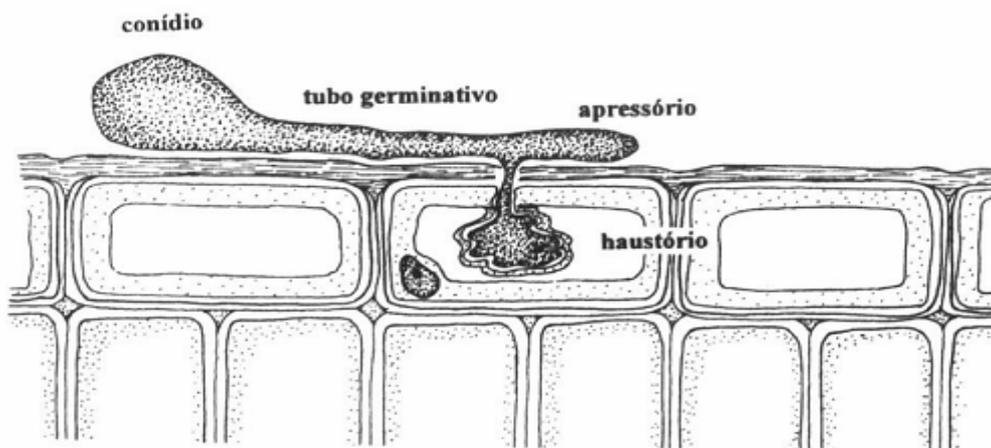


Figura 4 Conídio germinado penetrando diretamente na folha e estruturas associadas, fenômeno este ocorrendo após a fase de adesão, germinação e penetração do tecido da planta (BERGAMIN FILHO et al , 1995)

Considerando-se os sub-processos de pré-penetração e penetração, torna-se evidente que a penetração e infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada para assim estabelecer as relações parasitárias estáveis entre fungo e planta (AMORIM, 1995c). Dessa maneira, a penetração e infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada (FIGURA 4).

No caso de conídios de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo e milho, a adesão dos conídios foi importante para a germinação na folha (MERCURE et al., 1994a,b, 1995). Nicholson & Moraes (1980), demonstraram que os conídios eram envoltos em uma substância mucilagínosa solúvel em água, e, mais tarde foi determinado que era constituída de glicoproteínas ricas em prolina, enzimas e de compostos de baixo peso molecular, que inibem sua germinação (NICHOLSON et al, 1986; PASCHOLATI et al., 1993). Entretanto foi observado que a mucilagem produzida pelo conídio, solúvel em água, não era a responsável pela adesão final, pois o material adesivo ficava preso na folha estabelecendo uma ligação bastante íntima e forte com o hospedeiro, facilitando a penetração. Apesar disso, a caracterização de alguns materiais adesivos e o detalhamento completo dos mecanismos de adesão dos propágulos fúngicos ainda não foram esclarecidos (SUGUI, 1998; SUGUI et al, 1998).

Após a formação do tubo germinativo e o uso de diferentes solventes na extração da substância adesiva, foi observado que os compostos responsáveis pela adesão eram glicoproteínas e, a manose, era o carboidrato predominante. Em seguida, uma quantidade muito pequena de material (aproximadamente 5 mg) foi submetida à microanálise por raio X, para que se pudesse traçar o perfil de íons associados ao material adesivo e também das características morfológicas do material isolado. Ao final das análises ficou demonstrado que: a) o material apresentava componentes amorfos, fibrilares e particulados; b) a presença de cálcio, sódio, cloro, fósforo e enxofre antes da diálise do material e c) após diálise, somente os picos de cálcio e enxofre permaneceram inalterados. Estes resultados acabaram indicando que o material adesivo de *C. graminicola* apresentou cálcio e enxofre em sua constituição (LEITE et al., 2000).

Assim, o fungo deve primeiramente aderir à superfície do hospedeiro através do apressório, e lançar uma pequena hifa para o interior denominada de *peg* de penetração. No caso de penetração existem as formas direta ou indireta, onde o patógeno deve vencer as barreiras naturais do hospedeiro: cutícula epiderme

(aérea) e periderme (raízes e ramos) através de aberturas naturais (direta) ou produção de enzimas (indireta).

A folha de cevada apresenta na estrutura foliar, cutícula com estômatos, epiderme superior, parênquima paliçádico, lacunoso, xilema e floema mais no interior terminando com epiderme inferior (ESAU, 1976), a cutícula, parte mais externa é composta por substâncias cerosas; a parede celular tem em sua constituição três grupos: polissacarídeos (celulose; hemicelulose), pectina e proteínas. A celulose representa o maior constituinte da parede celular sendo formada por um polímero linear de açúcares D-glicose ligados por ligações β 1,4, que se ordenam em estruturas fibrosas, tendo por função criar uma parede celular rígida. A hemicelulose é o segundo polímero de maior importância da parede celular, sendo muito heterogêneo. Na parede celular de cereais e madeira é encontrada a xilana, constituída de D-xiloses ligadas por ligações β 1,4. Já as pectinas são formadas por complexos heteropolissacarídeos do ácido galacturônico, com ligação α 1,4. As proteínas por sua vez são representadas pelas cutinas, ricas em aminoácidos, aparecendo na cutícula, parede celular e lamela média (DE VRIES & VISSER, 2001; RAVEN et al, 1996).

As folhas das monocotiledôneas se organizam em nervuras paralelas sendo este o caso das gramíneas como a cevada. Estas por sua vez se compõe de células, que são constituídas por parede celular e protoplasto. Os cloroplastos são ricos em clorofila onde se processa a fotossíntese. As paredes celulares se compõe de celulose, hemicelulose, pectinas e possuem considerável importância por conferir forma e por se unir com outra parede de uma célula adjacente através da lamela mediana permitindo a constituição do tecido vegetal. No entanto as paredes celulares não se apresentam de forma contínua, permitindo comunicação entre os protoplastos através de pontuações, por onde passam os plasmodesmos, os quais, são filamentos citoplasmáticos normalmente visualizados por microscopia óptica e eletrônica que servem para o transporte de certas substâncias entre as células e interligam os protoplastos de células contíguas acabando por formar um conjunto contínuo por todo o corpo do vegetal denominado simplasto (RAVEN et al., 1996). Este simplasto para desempenhar suas funções fisiológicas deve promover trocas com o meio ambiente, como por exemplo as trocas gasosas (O_2 e CO_2). Para que isto ocorra, as folhas que são os órgãos aéreos da planta possuem estruturas especiais denominadas estômatos. Estes permitem as trocas gasosas com maior

eficiência com o ar atmosférico, ocorrendo grande melhora no processo fotossintético. Estas estruturas possuem também o importante papel de controle da taxa de evaporação da folha, o que pode ser decisivo na sobrevivência da planta em ambientes de umidade variável. (RAVEN et al, 1996; FERRI, 1979)

O fungo libera enzimas como as cutinases, celulases, hemicelulases, pectinases e proteinases que irão possibilitar a dissolução da parede celular para a completa infecção. Após a penetração, a colonização do tecido hospedeiro pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas, alterando a fisiologia da planta em favor do patógeno.

Segundo Agrios (1997), o conídio de *Bipolaris* penetra na folha através de estômatos ou diretamente na folha, se desenvolvendo e ocorrendo a patogênese.

Como o fungo *Bipolaris* é um organismo necrotrófico, isto é, capaz de matar as células da folha para garantir a sua sobrevivência, produz toxinas na penetração podendo induzir muitos dos sintomas comumente observados nas doenças como clorose, necrose (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). No caso do trigo foi possível observar na interação com fungos *B. bicolor*, *B. sorokiniana* e *D. tritici repentis*, a produção de metabólitos por esses fungos, quando em meio de cultura, podendo estes metabólitos induzir a necrose em folha parecida à de uma lesão causada pelos patógenos. Desses metabólitos (toxinas) foram identificadas proteínas de baixa massa molecular responsáveis pela produção da lesão podendo estar também presente em cevada (BACH & KIMATI, 1999).

Peltonen et al, (1997) observaram que no caso da presença de fenóis, os componentes da parede celular do fungo tinham a habilidade de desencadear a produção destas substâncias na parede celular da planta, quando *Bipolaris sorokiniana* foi inoculada em células de cultura de cevada.

Quando houver a interação compatível fungo-planta, o fungo irá aderir à folha da cevada onde ocorrerá a reconhecimento, a penetração e o prosseguimento da infecção dando prejuízos na colheita.

No uso de indutores, a etapa de reconhecimento envolve a ligação de um elicitor a um receptor presente na célula vegetal. O receptor, quase sempre de origem protéica pode estar localizado no interior da célula ou na membrana citoplasmática na maioria dos fungos ou nematóides. Os receptores, segundo Hutcheson (1998) estão localizados na membrana plasmática. Não se tem ainda muitos dados sobre o modo como se ligam elicitor e receptor, porém se houver

semelhança no reconhecimento com mamíferos pode ser multivalente a referida ligação. Assim, pode um elicitor se ligar a mais de um receptor ou a mais de um sítio de um mesmo receptor (BERTOZZI & KIESSLING, 2001). Após algum tempo do reconhecimento, a planta passa a apresentar reações de defesa.

Para ocorrer estas respostas há necessidade de geração dos sinais primários agindo em cascata e de sinais translocáveis que causariam a ativação de genes relacionados à defesa local como do sistema. Não se conhece ainda a natureza do sinalizador primário, sendo pouco provável que ele seja uma molécula orgânica, necessário para sua síntese ou liberação um outro sinal. Pode ser que o sinalizador primário seja um sinal elétrico que agiria, por exemplo, liberando a molécula sinalizadora compartimentalizada. Embora este sinal não seja compreendido completamente, não seguindo ao que parece às etapas envolvidas em uma linha reta terminando na ativação dos genes de defesa. (KUC, 1995)

Moraes (1998) afirmou que os fungos inoculados em plantas tratadas com elicitores de resistência apresentaram germinação normal de esporos com a emissão do tubo germinativo, formação de hifa de penetração e apressório, não ocorrendo porém a penetração normal. Várias hifas de penetração são aprisionadas por papilas ou tem o desenvolvimento retardado por oposições de parede, sendo que, nos dois casos, há a impregnação por compostos fenólicos, daí serem observadas restrições dos crescimentos de patógenos tendo em consequência uma diminuição da extensão e severidade nos sintomas de doenças nas plantas tratadas com antecedência, em comparação a plantas não induzidas e infectadas pelos mesmos fitopatógenos.

O mecanismo planta-patógeno-elicitor, em muitas interações, necessita ser ainda esclarecida. Entretanto, Tomyama et al., (1976) afirmaram que o mecanismo para interação pode assumir duas configurações sendo uma levando a restrição ativa do patógeno e a correspondente reação de indução de resistência (por produção de sinais) e, a outra, levando a uma acomodação do patógeno, podendo formar toxinas, e causando dano no hospedeiro, sem a reação imediata de metabólitos bioquímicos da planta para impedir a progressão do desenvolvimento do patógeno.

A produção de sinais (genes) como forma de defesa, resulta na indução deste sistema como uma nova resistência que foi adquirida frente a um patógeno que pode ser definida como sistema de resistência adquirido (SAR) ou a indução

sistêmica de resistência (IRS) que envolve a produção de ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico sendo efetiva, dependendo das condições naturais do mecanismo biológico de defesa das plantas contra as doenças (GOZZO, 2003; KOTHARI & PATEL, 2004).

3.5 Indução de resistência

Ray (1901) relatou pela primeira vez o termo “vacinação em plantas” utilizando formas atenuadas de ferrugem e, Bernard (1909) que trabalhou com bulbos tornando-as resistentes à *Rhizoctonia repens*, quando suas raízes foram previamente inoculadas com um isolado fraco do mesmo fungo. Posteriormente, ficou demonstrado que a resistência induzida nos bulbos de orquídea era resultante do acúmulo de certos compostos como o orquidol e o hircinol.

Smith (1911) verificou que margaridas Paris, quando inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens*, apresentavam tumores em seus tecidos e tornavam-se resistentes a uma posterior reinoculação com o patógeno. Estes dados não foram confirmados na época, porém, Brown (1923), utilizando uma suspensão das mesmas bactérias mortas, conseguiu proteger as plantas contra infecções posteriores.

Foi levantada a hipótese em 1933 por Chester, de que as plantas podem possuir sistema imunológico análogo ao dos mamíferos, existindo na folha infectada a produção de um sinal liberado e translocado para outras partes da planta de onde induziria a reação imunológica.

Ross (1961) denominou primeiramente esta forma de indução como resistência adquirida sistêmica (SAR), quando viu as folhas superiores de fumo apresentarem lesões necróticas após serem inoculados com o vírus do mosaico do fumo (TMV) em suas folhas inferiores, demonstrando assim que o fenômeno descrito como indução de resistência sistêmica era diverso da resistência induzida após inoculação com o patógeno foliar.

Muitos estudos mostram que a resistência pode ser induzida por meio de diferentes métodos como: pré-inoculação das plantas com raças avirulentas dos patógenos (DEVERAL et al., 1968; ELLISTON et al., 1971, 1976, a, b, c, 1977; KUC et al., 1975); inoculação com não-patógenos (DOLAN et al., 1986), inoculação com

patógenos termoinativados ou sonificado com ultra-som (HEALE & SHARMAN, 1977); pré-tratamento das plantas com metabólitos ou filtrados de fungos ou bactérias fitopatogênicos ou substâncias (BACH, 1997; EBRAHIM-NESBAT & SCHONBECK, 1985; GOTTSTEIN & KUC, 1989; GUZZO et al., 1993; MORAES, 1991; KESSMANN et al., 1994); e com agentes abióticos como luz ultravioleta, enxertos, ferimentos (KUC, 1982) entre outros.

Dai surgiram dois termos: resistência induzida local e, resistência sistêmica. Do ponto de vista prático a mais importante é a resistência sistêmica induzida porque há a reação da planta em seu todo e não só o tecido que se submeteu ao tratamento. Sistemicamente ou localmente, a resistência induzida apresenta-se dependente do tempo entre a aplicação do indutor e a inoculação do patógeno que depende da temperatura e da concentração do indutor versus patógeno (KUC, 1987; SEQUEIRA, 1979; 1983) é transmitida por cultura de tecido ou enxertia.

Em relação ao tempo, Pascholati et al. (1986) observaram o fenômeno de resistência em plantas de melão quando eram tratadas com o indutor 24 horas antes da inoculação com o patógeno *Mycosphaerella melonis*. Kutsner et al. (1993) observaram que utilizando o vírus da necrose do fumo (TNV) como indutor, eram necessários 4 dias para que folhas de feijão apresentassem proteção contra *Uromyces phaseoli*. Bach (1997) trabalhando com trigo- indutor goma xantana e *Bipolaris sorokiniana* conseguiram a indução no intervalo de tempo de 48 e 72 horas entre o indutor e o patógeno. Rodrigues et al. (2002) constatou o mesmo tempo para indução de resistência em plantas de cevada tratadas com alicina contra *Bipolaris sorokiniana*. Castro & Bach (2004) demonstraram os diferentes intervalos de tempo 24, 48, 72hs de indução de resistência em plantas de cevada tratadas com goma xantana contra *Bipolaris sorokiniana*.

A resistência induzida nas plantas não revela especificidade, porém efetivou-se contra vários tipos de patógenos em interações diferentes como: trigo-*Drechslera teres* e *Bipolaris sorokiniana* (BACH, 1997); cevada- *Bipolaris sorokiniana* (CASTRO et al., 2001; RODRIGUES, 2002); arroz-*Pyricularia oryzae* e *Bipolaris sorokiniana* (MANANDHAR et al, 1999); pimentão – *Phytophthora capsici* (HWANG et al, 1997); e café – *Hemileia vastatrix* (GUZZO et al., 1993).

Como mecanismo de ação dos indutores foi citado o SAR (Indução sistêmica adquirida) sendo caracterizado como indução contra doenças de grande espectro sendo ativada sistemicamente seguido de inoculações com patógenos necrotróficos

sendo vírus, bactéria ou fungo (KUC, 1982; KESSMANN et al., 1994). Os primeiros estudos demonstrando a presença de ácido salicílico (SA) ocorreram quando do tratamento de plantas de fumo com salicilatos que induzia PR proteínas (proteínas ligadas a resistência) promovendo resistência nas plantas contra diferentes patógenos incluindo TMV (WHITE, 1979). Görlach et al (1996) trabalhando com substâncias químicas sintéticas, do tipo benzotiadiazol descobriram que esta promoveu um sistema de resistência análogo ao SA atuando em plantas mono e dicotiledôneas contra um grande número de patógenos.

Entretanto, em 1998, Van Loon et al, definiram indução sistêmica de resistência (ISR) como o estado onde a planta aumenta a capacidade defensiva por um estímulo apropriado através da ativação latente induzida por diversos agentes, incluindo rizobactéria. O sistema biológico do ISR é distinto do SAR porque: ISR não é dependente do acúmulo de SA em plantas mas requer o funcionamento do ácido jasmonico (JA) e etileno como respostas da ativação (STICHER et al, 1997). JA apresenta a habilidade de estimular a expressão de proteínas envolvidas na defesa das plantas (como polifenoloxidasas, peroxidases e inibidores de proteases) associadas com aumento da resistência natural das plantas quando presentes no campo. Não existe marcador bioquímico estabelecido para este sistema biológico (D'ELANO-FRIER et al, 2004).

Dentro dos mecanismos de ação do SAR nos hospedeiros observou-se várias alterações bioquímicas como aumento de proteínas, açúcares, a diminuição de fenóis, atividades enzimáticas aumentada sendo todas responsáveis pela indução de resistência (KARN & KRUYPINSKI, 1983; REUVENI & BOTHMA, 1985; SRIVASTAVA, 1987; BACH 1989; 2003. Dentre as enzimas associadas a resistência temos as PR proteínas, representadas principalmente por beta-glucanase (BACH et al, 1999, 2003; BARTNICKI-GARCIA,1968; BENHAMOU et al., 1994; BOLLER, 1985; BUZI et al, 2004; DANN et al., 1996; GUZZO & MARTINS, 1996; PAN et al., 1991; SCHORODER et al., 1992).

Já existem indutores comercializados no mercado mundial como: o Bion®, o Messenger®, o Oxycomtm (KIM et al., 2001) e o Elexa®. Há um produto para a proteção do arroz chamado Oryzemat® (probenzole), que é usado contra o bruzone, na proteção do arroz (KOGANEZAWA et al., 1998; MOLINA et al., 1998; HAMMERSCHIMIDT, 1999; OOSTENDORP et al., 2001; METRAUX, 2001; HOFGAARD et al., 2004).

3.5.1 Indutor Goma xantana

A goma xantana é extraída da cápsula de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e consiste em um polissacarídeo de alto peso molecular produzindo viscosidade, sendo utilizada como espessante em preparações alimentícias. A estrutura conhecida como molécula de goma xantana apresenta β -1, 4-glicose, idêntica à molécula de celulose. Existe também um trissacarídeo ligado contendo ácido glucurônico unido a duas manoses e outra glicose ligada à posição do carbono 3 (Figura 5). A firma Danisco produz a goma xantana comercial (Food grade).

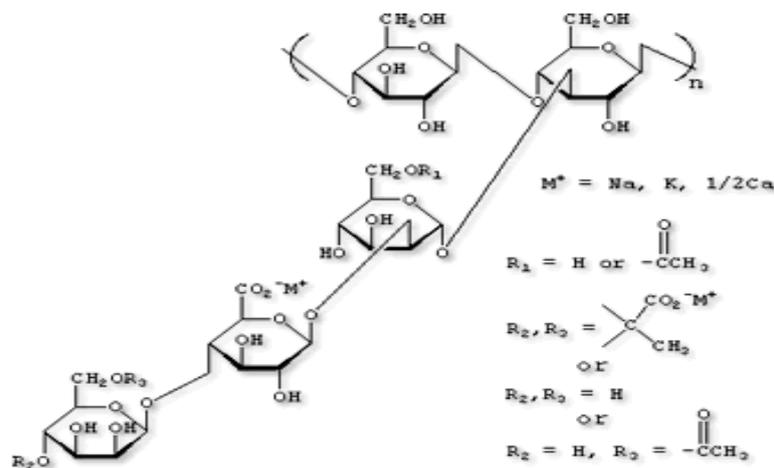


Figura 5 : Estrutura molecular da goma xantana

Castro (2003) e Castro & Bach (2004) trabalhando com goma xantana como indutor em plantas de cevada, demonstrou indução de resistência na cultivar Embrapa 128 variando de 94, 97 a 99% nos diferentes intervalos de tempo (24h, 48h e 72h). Já, no meio de cultura com goma xantana, o fungo desenvolveu e esporulou tanto quanto no meio de controle. Diante dos resultados tem-se que a goma xantana apresentou-se somente como indutor de resistência.

3.5.2 Indutor Alicina

O alho (*Allium sativum*) é uma das plantas comestíveis que tem gerado grande interesse, devido à suas propriedades medicinais (ANKRI & MIRELMAN, 1999). Durante mais de 100 anos os químicos tinham apenas o conhecimento que o

principal componente do óleo de alho, obtido via destilação, era o dialil-dissulfeto (MASSABNI et al., 1998). Somente na década de 40 é que ocorreu a identificação do componente responsável pelas propriedades antibacterianas, que Cavallito & Bailey (1944) denominaram de alicina, que é um composto formado naturalmente pela ação da enzima alinase sobre a aliina (STOLL & SEEBECK, 1948).

Vários autores descreveram o efeito inibitório dos produtos do alho contra patógenos quando usado extrato aquoso como antibacteriano e antifúngico. Como antibacteriano, exercendo efeito sobre bactérias como *Helicobacter pylori* (CELLINI et al., 1996 e JONKERS, et al., 1999) *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecium* (ANKRI & MIRELMAN, 1999), entre outras. Como antifúngicos, exercendo efeito sobre fungos como *Aspergillus parasiticus* (LAWSON, 1996); *Trychophyton*, *Epidermophyton* e *Mycrosporium*, inibindo a germinação de esporos e o crescimento micelial (YAMADA & AZUMA, 1997).

Como indutor de resistência Rodrigues et al. (2002) descreveram a capacidade da alicina presente em extrato aquoso, em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana*. Rodrigues et al., (2002), demonstraram que plantas de cevada da variedade Embrapa 128, quando pulverizadas com alicina 72 horas, antes da pulverização com o patógeno, apresentaram proteção de 100%. Quando o tratamento com alicina foi realizado 24 e 48 horas antes da pulverização com o patógeno, algumas plantas apresentaram lesão de menor tamanho levando a uma proteção de 80 a 93 % respectivamente. Quando a alicina foi incorporada no meio de cultura com o fungo, foi observado que o produto não apresentou efeito sobre o crescimento no meio embora tivesse menor esporulação quando correlacionado com meio de cultura sem alicina. Diante deste fato a alicina não teve efeito na germinação mas somente na esporulação que ocorreu somente após 15 dias de desenvolvimento. Assim, como na planta o efeito ocorreu em 72 horas, pode-se confirmar que alicina foi indutor de resistência.

Assim, no presente trabalho foram utilizados os dois indutores a fim de avaliar o desenvolvimento do fungo nas plantas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios do Centro Universitário Nove de Julho (UNINOVE).

4.1. Preparação das plantas de cevada

As sementes de cevada das cultivares Embrapa 128 e Embrapa BRS 195 foram fornecidas pela Fundação Agrária de Guarapuava, Paraná, e semeadas em vasos, mantidas em casa de vegetação à temperatura ambiente, até o estágio 5 da escala de Feekes-Large (LARGE, 1954). Na composição do substrato foi utilizada uma parte de solo vermelho, oriundo do Paraná e uma parte de terra vegetal adubada com macronutrientes nitrogênio-fósforo e potássio (NPK na formulação 10-10-10) e micronutrientes, marca Ouro Verde (de acordo com a especificação do produtor).

4.2. Patógeno e patogenicidade

O fungo *Bipolaris sorokiniana*, foi isolado diretamente de folhas de cevada, oriundas do campo da Fundação Agrária de Guarapuava, Paraná, e, mantido em crescimento em meio de cultura BAD (batata-dextrose-ágar). Para isto, as folhas foram colocadas em placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e mantidas 24 horas sob luz. Os conídios desenvolvidos, observados através do microscópio estereoscópico, foram transferidos para ágar-água 2% em placas de Petri. Após 10 dias do desenvolvimento da cultura, o fungo foi repicado para placa de Petri contendo meio BAD. As culturas foram preservadas em tubos contendo meio inclinado de BAD e mantidas à temperatura ambiente.

Para a medida da esporulação, os conídios foram removidos do substrato com auxílio de 5 mL de água destilada esterilizada, contendo 0,05% de Tween 20 (poli-oxietileno sorbitan monolaurato, Sigma Chemical Co.), filtrados através de gaze para a eliminação dos restos de meio de cultura e de micélio e, contados no hematócrito (Improved Neubauer 1/400 SQ. 1/10 mm deep ultraplano) até a concentração de 2×10^5 conídios mL⁻¹.

Estes conídios na concentração de 2×10^5 conídios mL⁻¹, foram aspergidos em plantas dos cultivares Embrapa 128 e BRS 195 que foram mantidas em câmara escura úmida durante 24h, e em seguida foram colocadas em casa de vegetação para que fosse averiguada a ocorrência de lesões causadas pelo patógeno.(BACH, 1997)

4.3. Extração dos indutores

4.3.1 Goma xantana

No caso da goma xantana utilizou-se a comercial grau alimentício da marca Rhodigel 80 (Procedência Danisco e comercializada por Plury Química Ltda.) na concentração de 0,5 mg/mL, diluída em água (de acordo com metodologia descrita por BACH, 1997).

4.3.1.2 Teste biológico

Um mililitro da solução de goma xantana na concentração de 0,5 mg/mL, diluída em água foi transferido em um tubo de ensaio contendo 10mL de BAD (batata-ágar-dextrose) esterilizado e transferidos para placas de Petri, sendo depois inoculado o fungo. No intervalo de 0 a 8 dias foi medido o crescimento do fungo e, no final de 10 dias foi feita a suspensão de conídios e submetida à contagem em hematocítômetro. Paralelamente foi inoculado o fungo em placas controle. Neste experimento foram utilizados dois isolados.

4.3.2 Alicina

Para a extração de alicina foi utilizado o método baseado em Massabnil et al. (1998), baseado na trituração com água e etanol (150mL de água em 1L etanol), homogeneizado por 30 minutos sob agitação, e incubado por 3 dias a 4°C, e depois filtrado. O filtrado foi submetido a rotoevaporação na temperatura de 45°C, sendo removido etanol, e o extrato aquoso armazenado em frasco âmbar e estocado em freezer a -20° C. A determinação da concentração de alicina foi realizada pelo método espectrofotométrico em 412nm, baseado no método de MIRON et al. (1998)

com NTB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, Sigma Chemical Co.). A concentração utilizada foi de 0,97µg de alicina /mL de extrato.

4.3.2.1 Teste biológico

Um mililitro do extrato bruto, foi transferido em um tubo de ensaio contendo 10mL de BAD (batata-ágar-dextrose) esterilizado e transferido para placas de Petri, sendo depois inoculado o fungo. No intervalo de 0 a 8 dias foi medido o crescimento do fungo e, no final de 10 dias foi feita a suspensão de conídios e submetida à contagem em hematocítômetro. Paralelamente foi inoculado o fungo em placas controle. Neste experimento foram utilizados dois isolados.

4.4 Indução de resistência

Plantas de cevada cultivares Embrapa 128 e Embrapa BRS 195 foram submetidas a 10 tratamentos (com 10 plantas cada), para cada cultivar, todas com 3 repetições (Tabela 1).

Os tratamentos para cada cultivar basearam-se em 2 elicitores escolhidos sendo: goma xantana e alicina. Os tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que para cada elicitor, as plantas de cevada foram separadas em grupos como **a-sadias**: Pulverizadas com 10mL de água; **b- infectadas**: Pulverizadas com 10mL da suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana*; **c-elicitor** (goma xantana e alicina,): Pulverizadas com 10mL dos indutores goma xantana e alicina para cada cultivar; **d-elicitor (goma xantana, alicina)-24h**: Pulverizadas com 10mL do extrato dos indutores Goma xantana e Alicina, e inoculadas após 24 horas com 10mL da suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana*; **e-elicitor (goma xantana, alicina)-48h**:: Idem ao grupo d entretanto após 48 horas; **f-elicitor (goma xantana, alicina)-72h**: Idem ao grupo d entretanto, após 72 horas. Todos os tratamentos foram repetidos por 3 vezes.

As plantas após os tratamentos foram mantidas em câmara úmida (100% umidade relativa (UR)), escura e em temperatura ambiente e, em seguida, foram transferidas para casa-de-vegetação, até o aparecimento de lesões dando um total de 7 dias após inoculação com o patógeno.

Foram coletadas após 4 e 7 dias folhas de cada grupo, e feitas as contagens das folhas com lesão e as sem lesão, para que pudessem ser avaliadas as porcentagens de proteção de cada indutor, as folhas coletadas com 4 dias foram

em seguida clarificadas e montadas em lâminas, para que tivessem seus conídios contados, e para que se realizassem as fotomicrografias ópticas segundo metodologia descrita por Bach (1997).

Tabela 1: Cultivar e tratamentos que foram submetidas plantas de cevada

Cultivar	Tratamentos	Cultivar	Tratamentos
Embrapa 128	Sadia	Embrapa BRS 195	Sadia
	Infectada		Infectada
	Controle goma xantana		Controle goma xantana
	goma xantana -24h		goma xantana -24h
	goma xantana -48h		goma xantana -48h
	goma xantana -72h		goma xantana -72h
	Controle - Alicina		Controle - Alicina
	Alicina -24h		Alicina -24h
	Alicina -48h		Alicina -48h
	Alicina -72h		Alicina -72h

4.5. Coleta e clarificação das folhas

Das folhas coletadas de todos os tratamentos, foram retiradas 4cm do meio da folha e, depois clarificadas em etanol pré-aquecido em banho maria, e mantido por cerca de 2 minutos para extração da clorofila. Posteriormente, foi retirado o etanol e colocado lactofenol-azul de algodão. As amostras foram montadas em lâminas de vidro para microscopia com lactofenol (BACH, 1997). A observação, em microscópio Quimis trinocular Q709-PL, acoplada a computador e câmera Moticam 350 (Sangari do Brasil, CCD 640x480 pixels) foi realizada em 60 conídios por amostra (levando-se em conta a média de 10 pedaços de folhas), e avaliada a porcentagem de germinação dos conídios, número de hifas, e penetração nas células epidérmicas ou estômatos, todos replicados em 3 repetições. Com o mesmo aparelho foram realizadas fotos de algumas amostras.

4.6 Análise estatística

Todos os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pelo teste T (Student's) junto ao Excel 7.0 ou, ANOVA (Origin).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de patogenicidade

As plantas de cevada após a pulverização com conídios isolados a partir de folhas do campo, apresentaram as manchas marrons fechando o postulado de Koch, que significa que o conídio isolado foi capaz de reproduzir a doença em folhas de cevada em casa-de-vegetação.

As lesões (Figura 6) foram observadas após 8 dias da inoculação de acordo com a metodologia de Bach & Kimati (1995); Bach (1997); Silva (2005) e Felipe (2005).

A diferença das duas cultivares utilizadas consta que a Embrapa BRS 195 tem sido mais resistente no campo do que a cultivar Embrapa 128.

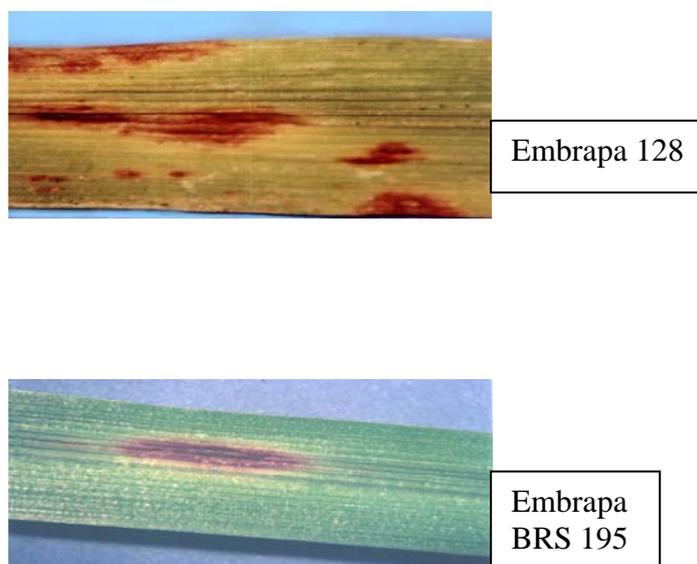


Figura 6: Aspecto visual das folhas de cevada infectadas das variedades Embrapa 128 e Embrapa BRS 195.

5.2. Aspecto estrutural das folhas de cevada Sadias.

A ultraestrutura de uma folha sadia, sem clarificação, apresenta estômatos, cloroplastos bem definidos, não apresentando diferenças entre as duas cultivares analisadas no presente trabalho como Embrapa 128 e Embrapa BRS 195 (Figura 7).

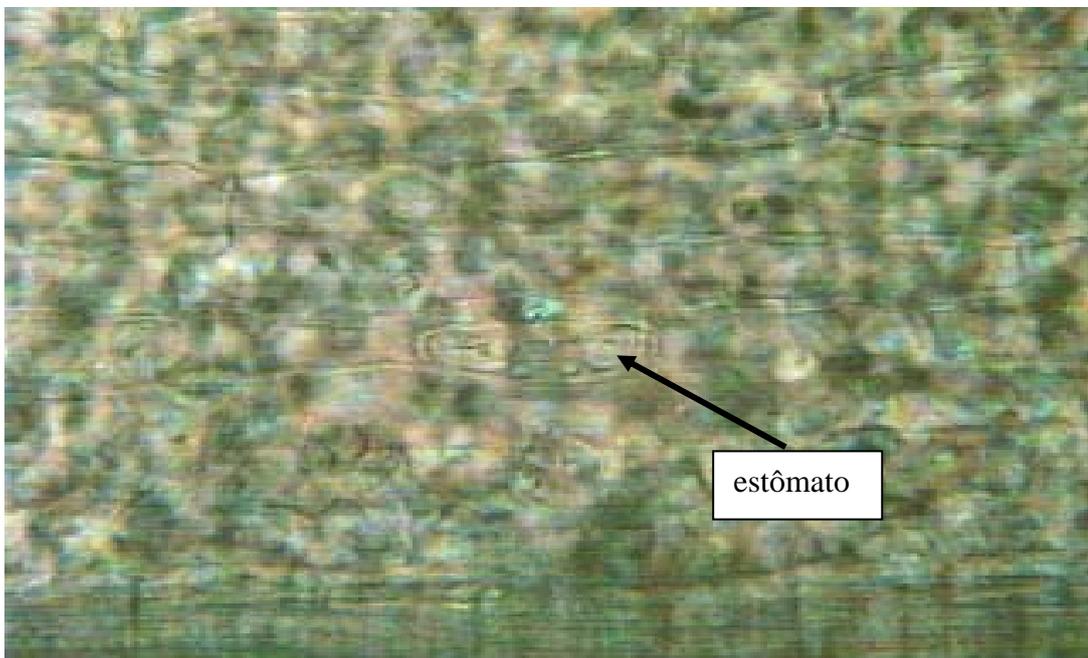


Figura 7: Folha de cevada Embrapa 128 sadia podendo visualizar estômatos, células, bem como cloroplastos (aumento de 400x).

5.3. Aspecto visual do fungo *Bipolaris sorokiniana*

O fungo *Bipolaris* classificado por Alcorn (1988), apresenta características básicas para diferenciar da *Drechslera* e *Exserohilum*. Na tabela 2 constam somente as características do fungo *Bipolaris*.

Tabela 2: Características do fungo *Bipolaris*

CARACTERÍSTICA	<i>Bipolaris</i>
Forma do conídio	Fusóide, obclavado-fusóide, raramente verdadeiramente cilíndrico, reto ou curvado.
Hilo	
Germinação	Comumente de uma ou ambas células polares, raramente de células intermediárias.
Posição de emergência e direção do crescimento do tubo germinativo basal	Semiaxial, próximo ao hilo, raramente lateral.
Ontogenia do septo	Mediano a submediano.
Primeiro	Delimita a célula basal.
Segundo	Distal.
Nodos conidiogênicos	Liso ou verruculoso.

Diante disto, segundo Alcorn (1988), quando o fungo germina este deve comumente fazer por uma ou por ambas células polares.

Toledo et al., (2004) demonstraram que em 25 conídios o tamanho do *Bipolaris sorokiniana* mantido em BDA apresentou 65,28 µm de comprimento, e 22,78 µm de largura contendo 4,83 pseudoseptos. Quanto aos conídios desenvolvidos em folhas verdes de cevada os mesmos apresentaram conídios nos tamanhos 94,7 µm de comprimento e 17,75 µm de largura contendo 8,03 pseudoseptos. Também foi possível observar, que os conídios desenvolvidos em tecidos verdes (folhas) apresentaram coloração marrom-oliva-clara e ligeiramente curvados, ao passo que os esporos desenvolvidos em sementes ou meios de cultura mostraram-se mais escuros (marrom-oliva-escuros) e retos.

Os resultados obtidos no presente trabalho, vem de encontro com Alcorn (1988) e Toledo et al. (2004) pois, na germinação dos conídios em folhas de cevada, foi possível observar que a maioria dos conídios germinaram bipolarmente, isto é, por ambas células polares sendo também ligeiramente curvados. Quanto ao

conídio, a coloração observada na folha sem tratamento, foi marrom-oliva-clara mas após a clarificação, observou-se somente a cor marrom.

Vários autores descreveram que conídio, hifa, apressório e haustório geralmente estão envolvidos com matriz extracelular (ECM), também referido como mucilagem ou material extracelular ou ainda filme adesivo (BRAUN & HOWARD, 1994; NICHOLSON & KUNOH, 1995; NICHOLSON, 1996). Não se conhece muito da importância ou função da matriz extracelular mas, sugere-se que possui função de adesão, reduzindo a dissecação do conídio (NICHOLSON, 1996). No caso de *Bipolaris sorokiniana*, Apoga & Jansson viram um fluido ao redor do conídio, hifa e apressório somente através de técnicas crio-histológicas, pois o fluido foi confirmado ser solúvel em água (Figura 8).

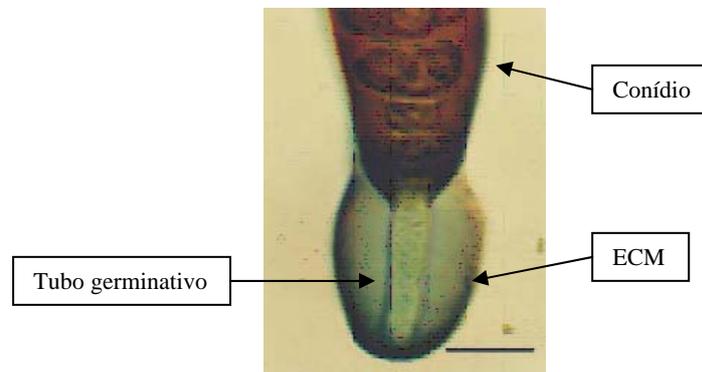


Figura 8: Tubos germinativos fixados com ouro coloidal demonstrando o fluido como ECM (matriz extracelular) como adesão do fungo. (APOGA & JANSSON, 2000)

Segundo Jansson & Åkesson (2003), quando a hifa foi descolada da folha acabou ficando uma marca bem visível do local, onde ocorria a adesão (Figura 9).

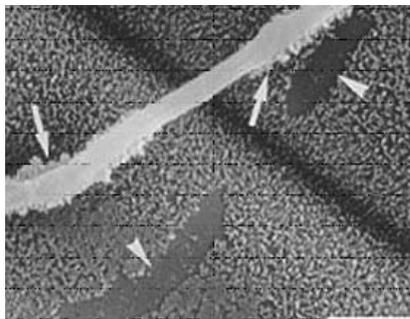


Figura 9: Hifa fixada com ouro coloidal visto em microscopia eletrônica, sendo descolada da folha. Setas indicam o local da retirada. Foto JANSSON & ÅKESSON (2003)

No início do processo de clarificação das folhas oriundas de alguns tratamentos com indutores, muitas vezes foi encontrado no fundo do tubo alguns conídios que se destacavam da folha. O motivo pelo qual isto ocorria pode ser explicado pela presença da substância adesória ser solúvel em água, como descrito por Apoga & Jansoon (2000). Diante disto, a descoloração foi realizada em álcool 92%, por este possuir menor teor de água. Mesmo assim, algumas folhas após clarificação, quando levado ao microscópio, foi possível visualizar pequenas manchas de coloração azul podendo ser este o local onde o conídio estava aderido (Figura 10).

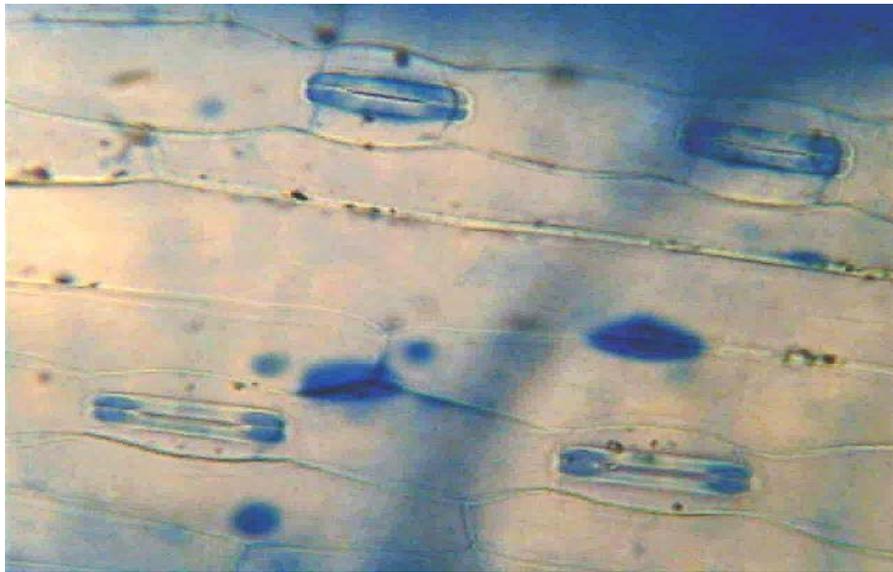


Figura 10: Pequenas manchas de cor azul indicando possível local, onde o conídio estava aderido a folha 96 h após a inoculação (400x de aumento).

Outro fator importante a ser citado é em relação ao crescimento tigmotático de *B. sorokiniana*, observado por Clay et al. (1994), pois o fungo necessita do sinal da superfície para formar o apressório. O ponto de penetração e formação do apressório pode ser através do estômato ou pela superfície foliar como descrito por Jansson & Åkesson (2003). Os resultados obtidos em microscopia confirmaram que a penetração e, formação do apressório, ocorreu através do estômato e superfície foliar (Figura 11)



Figura 11: Aspecto do conídio com germinação bipolar, penetração diretamente na superfície com formação de apressório e de papila. (400x aumento)

5.4. Plantas infectadas dos cultivares EMBRAPA 128 e EMBRAPA BRS 195.

Em relação as plantas de cevada Embrapa 128, infectadas, após clarificação e observação em microscopia óptica, foram observados vários conídios germinados, com célula mãe de haustório aparente e pontos de penetração das referidas hifas nas folhas ou através do tecido ou através dos estômatos. Todas estas observações podem ser confirmadas através das Figuras 12 e 13. Diante disto, pode-se confirmar que o patógeno germinou, formou apressório e penetrou na folha de cevada provocando manchas foliares.

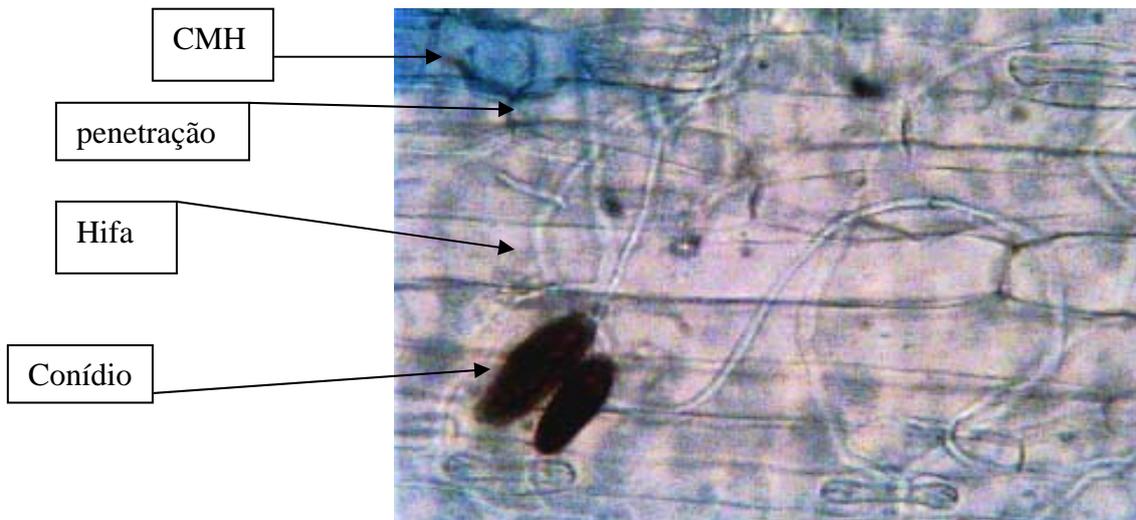


Figura 12: Folha de cevada Embrapa 128 infectada com isolado de *Bipolaris sorokiniana* (aumento 400x). Na foto observa-se CMH (célula mãe de haustório), hifas e pontos de penetração.

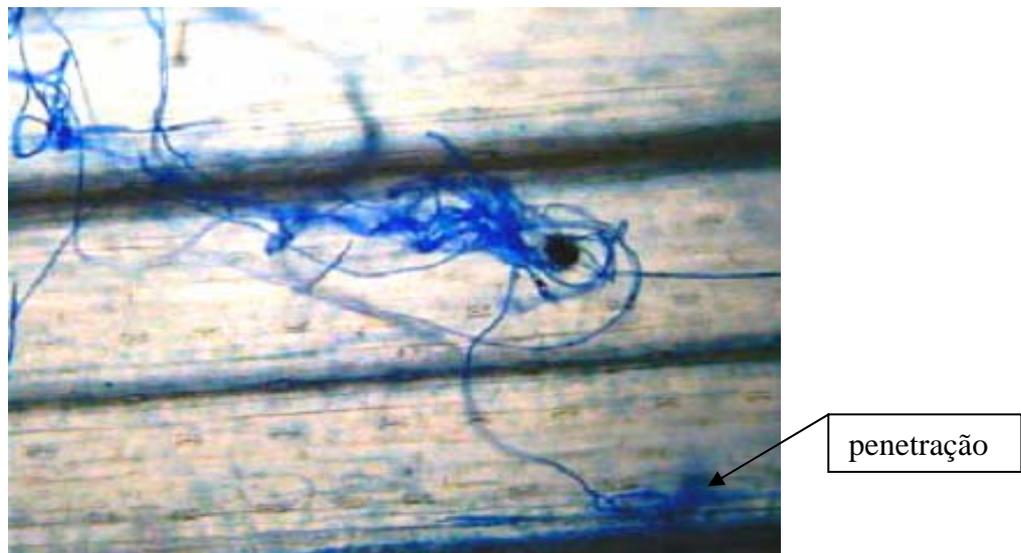


Figura 13: Foto mostrando conídio germinado com hifas e, apressório com ponto de penetração (seta) na cevada Embrapa 128 (100x)

O fungo *Bipolaris sorokiniana* na folha de cevada Embrapa 128 apresentou germinação bipolar e, ao formar a hifa e o ponto de penetração esta pôde ser realizada bem longe do início da germinação. Isto se deve ao efeito tigmotático que faz com que muitas vezes a hifa passe por cima de um estômato, não reconhecendo-o, desta forma a hifa segue em frente, em busca de outro ponto de

penetração. Outras vezes este fungo pode produzir enzimas que, irão degradar a parede da folha e formando ai pontos de penetração, que podem estar localizados perto ou longe do conídio germinado. Assim, um conídio germinado pode produzir duas hifas e pontos de penetração nos estômatos ou diretamente na folha entretanto, estas hifas podem sofrer anastomose e a partir deste lugar formar outros pontos de penetração. Isto vem explicar porque a partir de uma hifa, pode-se ter vários pontos de penetração (KUMAR, 2002).

Na contagem de conídios dos 50 pedaços de folhas foram contados 60 conídios sendo destes, 52 germinados com várias hifas, sendo bipolar e com vários pontos de penetração e, somente 8 conídios não germinaram (Tabela 7). O motivo da não germinação pode estar ligado a morfologia dos conídios, por serem menores, se encontrando em forma não maturada, isto é, o conídio não está apto para germinação (FIGURA 14).

Pelo motivo do conídio apresentar vários apressórios, em folhas suscetíveis, se torna impossível a contagem dos pontos de penetração ,pois as várias hifas se reencontram, não se sabendo muitas vezes de qual conídio vem. Outro fato está relacionado a enzimas que são produzidas na ponta da hifa, onde estas degradam a parede e penetram na mesma, sem precisar do estômato.

Na contagem de conídios dos 50 pedaços de folhas da cultivar da Embrapa BRS 195, foram contados 60 conídios destes, existiram 46 germinados com várias hifas, sendo bipolar e com vários pontos de penetração e, somente 14 conídios não germinaram. O motivo da não germinação pode estar ligado a morfologia dos conídios, por serem menores, não se encontrando em sua forma maturada, isto é, com o conídio não completo para germinação (Fig. 14b).

Da mesma forma que ocorreu na cultivar 128, com a cultivar BRS 195, os vários pontos de penetração foram devidos ao fungo por ter germinação bipolar, apresentando o estímulo tigmotático e enzimático. Por este motivo, produziu hifas compridas indo de um lado ao outro da folha e vários pontos de penetração sendo impossíveis de contar todas (Figura 12, 13, 14).



14 a



14 b

Figura 14: Conídio germinado bipolar mostrando alguns apressórios (a) e conídio não germinado (b) (400x).

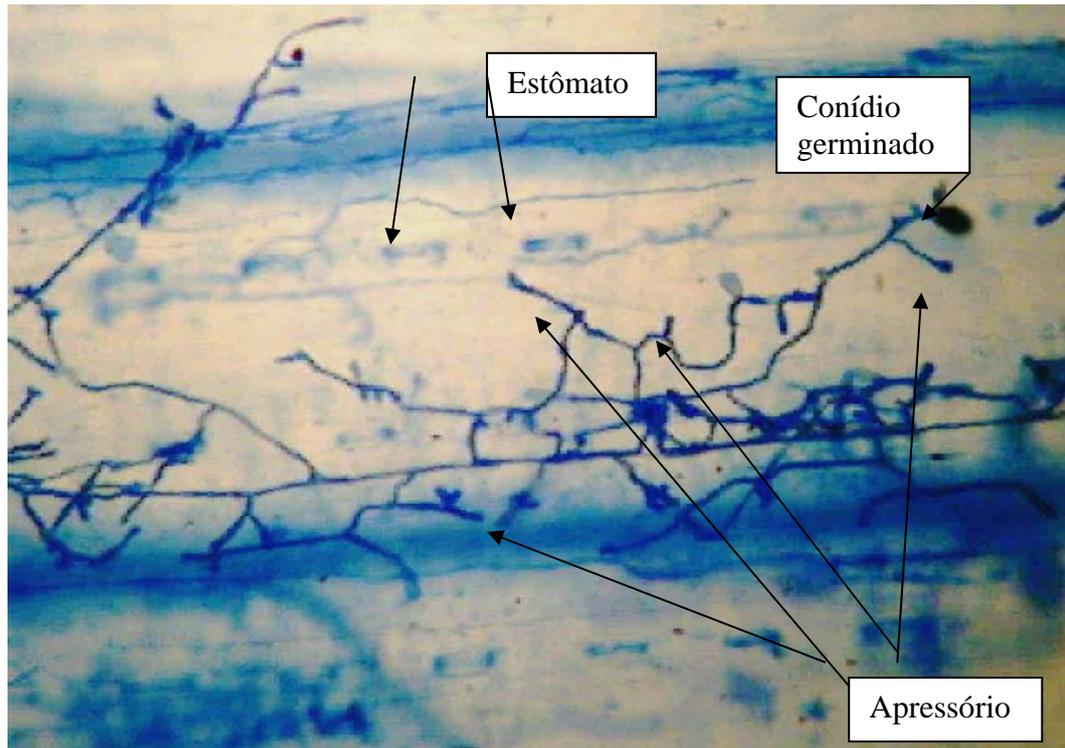


Figura 15 : A foto mostra um conídio germinado e o caminho percorrido pela sua hifa, bem como a formação de apressórios na superfície foliar e, estômatos (100x)

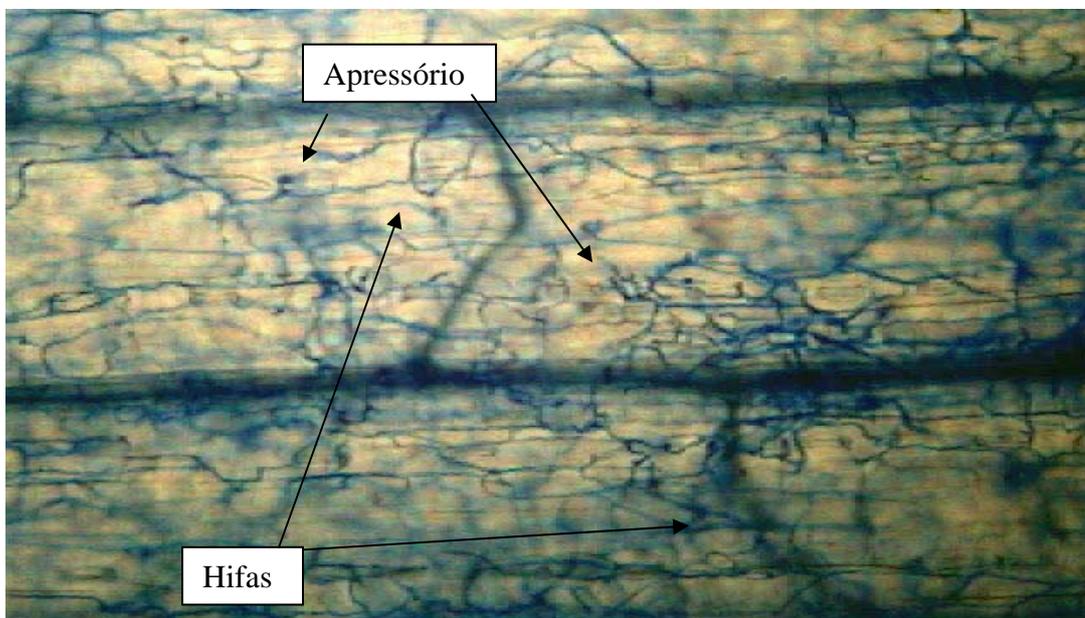


Figura 16: Superfície foliar do cultivar EMBRAPA BRS 195 mostrando várias hifas, nota-se alguns apressórios indicados pela seta, verifica-se a ausência de conídio que se encontra em um campo não abrangido pelo campo de visão da objetiva (100x)

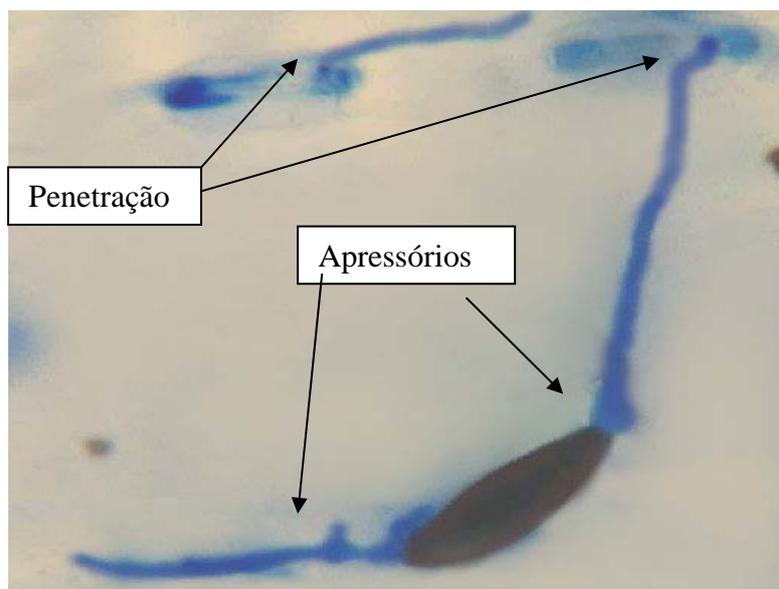


Figura 17: Conídio germinado bipolarmente mostrando apressórios e pontos de penetração em cultivar Embrapa BRS 195 (400x)

5.5 MECANISMO DA PATOGENICIDADE

Diante dos resultados, pode-se afirmar que primeiramente ocorre a adesão do conídio à folha através de um fluido mucilaginoso, formando uma espécie de matriz extracelular, solúvel em água (constituída por glicoproteínas de alto peso molecular), segundo Apoga & Jansoon (2000). O processo de infecção se inicia com a adesão do conídio à superfície da folha, e com a formação da matriz extracelular; em seguida ocorre a germinação bipolar, aparecendo uma estrutura denominada tubo germinativo que origina uma hifa, esta pelo efeito tigmotático e enzimático acaba por formar uma apressório penetrando, diretamente na lamela, ou então através do estômato apenas pelo efeito tigmotático (BERGAMIN FILHO et al , 1995). Segundo Jansoon & Åkesson, 2003, a matriz extracelular tem em sua composição uma fitotoxina denominada prehelmentosporol, que causa a morte das células do parênquima originando lesões. Isto ocorreu nas duas cultivares de cevada (Embrapa 128 e Embrapa BRS 195) sendo que as folhas de cevada após sete dias demonstraram o aparecimento das lesões marrons, características da doença conhecida em campo como mancha marrom.

5.6 Teste biológico dos indutores de resistência goma xantana e alicina

5.6.1. Goma xantana

No teste biológico, incorporando a goma xantana em meio de cultura de BAD, foi observado o desenvolvimento micelial e realizada a quantificação de conídios (Tabela 3). Os resultados demonstraram que o desenvolvimento foi igual, sem diferença estatística, em relação ao controle bem como na contagem de conídios. Isto vem de encontro com Castro (2003) onde também observou que a goma xantana não teve efeito no desenvolvimento do fungo quando em meio de cultura.

Tabela 3: Desenvolvimento do isolado de *Bipolaris sorokiniana* no meio de cultura

		Dias de desenvolvimento					
	isolado	2 dia	4 dia	6 dia	8 dia	Contagem**	
G.xantana	Bs	0,90	1,40	1,75	1,95 a	2,10a	
controle	Bs	0,75	1,25	1,50	1,85 a	2,15a	

*medidas do crescimento micelial em cm. Média de 5 placas.

** contagem dos conídios após 10 dias de crescimento em câmara Newbauer $\times 10^6$. Média de 5 placas. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste T ($P > 0.05$).

5.6.2. Alicina

No teste biológico, incorporando a alicina em meio de cultura de BAD, observou-se o desenvolvimento micelial, e, a quantificação de conídios. Na tabela 4, pode-se observar que alicina promoveu um crescimento micelial maior do que o controle, entretanto, não foi capaz de produzir o mesmo número de conídios do que o controle, isto é ocorreu inibição ao redor de 30% na produção de conídios. Diante disto, pode-se afirmar que a alicina acelera o desenvolvimento mas inibe a produção de conídios, isto em meio de cultura.

Tabela 4: Desenvolvimento do isolado de *Bipolaris sorokiniana* no meio de cultura

		Dias de desenvolvimento					
	isolado	2 dia	4 dia	6 dia	8 dia	Contagem**	
Alicina	Bs	0,4*a	2,5*a	3,5*a	3,7*a	1,4a	
controle	Bs	0,4*a	1,8*b	2,5*b	2,5*b	2,0b	

*medidas do crescimento micelial em cm. Média de 5 placas.

** contagem dos conídios após 10 dias de crescimento em câmara Newbauer x10⁶. Média de 5 placas.

Letras em colunas diferentes, são diferentes significativamente entre si pelo teste T. (P>0,05)

5.7. Indução de resistência com Goma xantana e alicina nos Cultivares Embrapa 128 e Embrapa BRS 195

5.7.1. Indução de resistência com Goma xantana no Cultivar Embrapa 128

A goma xantana é um dos elicitores observados por Bach (1997) para trigo. Castro & Bach (1997), observaram a goma como sendo indutor de resistência em plantas de cevada, onde obteve a maior porcentagem de proteção no intervalo de 72 horas. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a cultivar Embrapa 128, apresentou 87,5% de proteção em 24 horas e, em contrapartida no intervalo de 48 horas com 96,8% além de que com 72 horas 100%, sendo que no intervalo de 72 horas foi obtida a maior porcentagem de proteção. Interessante observar que as lesões observadas eram de menor tamanho nos intervalos de 24 e 48 horas comparado com as plantas infectadas (resultado não demonstrado em figura) (Tabela 5).

Das plantas submetidas ao tratamento com goma xantana, pedaços das folhas foram clarificadas e observadas ao microscópio de onde, pôde-se observar que os conídios foram capazes de formar apressórios e penetrar na célula. Assim, dos 60 conídios com germinação, 60% daqueles que germinaram, apresentaram apressórios nas duas direções dos conídios, devido a sua bipolaridade (Figura 18, Tabela 7).

Isto vem demonstrar que o indutor goma xantana não produziu efeito sobre o conídio mas sim, algum sinal na planta deve ter produzido a resposta de resistência.

5.7.2. Indução de resistência com Goma xantana no Cultivar Embrapa BRS 195

Já para o cultivar Embrapa BRS 195 o intervalo de 72 horas, foi o que apresentou 100% de proteção, entretanto 24 e 48 horas apresentou acima de 90% de proteção (Tabela 5).

Das amostras de folhas que foram clarificadas, pode-se observar que ocorreram a formação de apressórios, e, pontos de penetração na parede e no estômato (Tabela 7, Figura 19) demonstrando que a goma xantana teve efeito na planta como indutor e não como controle químico sobre a folha.

Tabela 5: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada cultivar Embrapa 128 e Embrapa BRS 195 contra *Bipolaris sorokiniana*, utilizando goma xantana como indutor.

Tratamentos*	Embrapa	128
	folhas infectadas**	% Proteção***
Infectada	50	0 a
Goma xantana -24H	4	87,50 b
Goma xantana -48H	1	96,87 b
Goma xantana -72H	0	100,00 b
	Embrapa	BRS 195
Goma xantana -24H	6	94,4b
Goma xantana -48H	5	97,2b
Goma xantana -72H	0	100,0b

*Tratamentos: Infectada: plantas aspergidas com suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana*; Goma xantana – 24h: plantas aspergidas com goma xantana 24h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*; Goma xantana – 48h: plantas aspergidas com goma xantana 48h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*; Goma xantana – 72h: plantas aspergidas com Goma xantana 72h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*;

** Número de folhas infectadas representam a média de um total de 10 plantas/tratamento.

***Porcentagem de proteção seguidas por letra b, são significativamente diferentes do controle (plantas infectadas) pelo teste T (P<0,05).

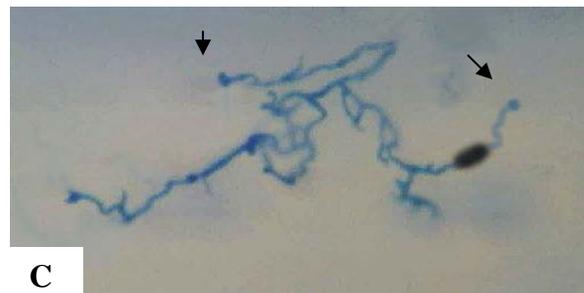
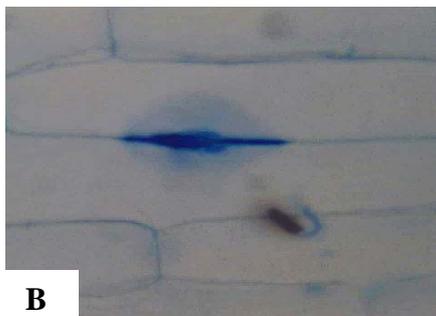
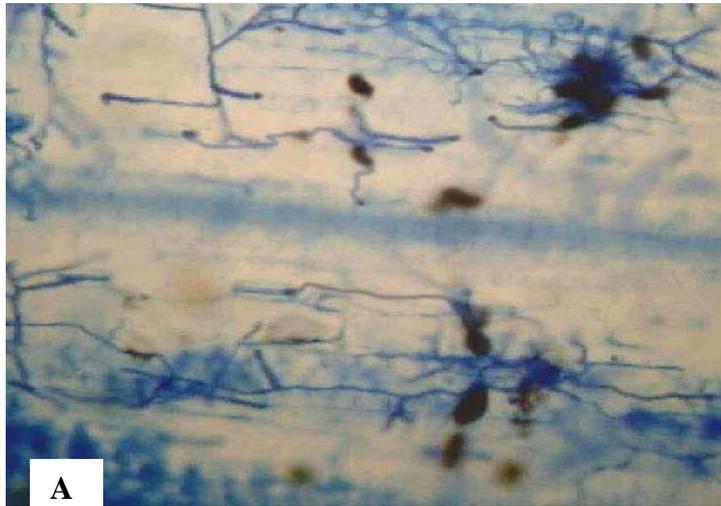


Figura 18: Aspecto das folhas de cevada Cultivar Embrapa 128 tratadas com goma xantana.

- (A) Folha tratada com 48h de intervalo de tempo entre goma e conídio. Foto 100x de aumento
- (B) Foto de conídio germinado e local com halo na folha podendo indicar local de penetração com reação como “papila”. Tratamento com goma xantana e após 72h suspensão de conídios. Foto aumento 400x.
- (C) Foto de um conídio germinado com apressório e penetração. Tratamento com goma xantana e após 72h suspensão de conídios. Foto aumento 400x.

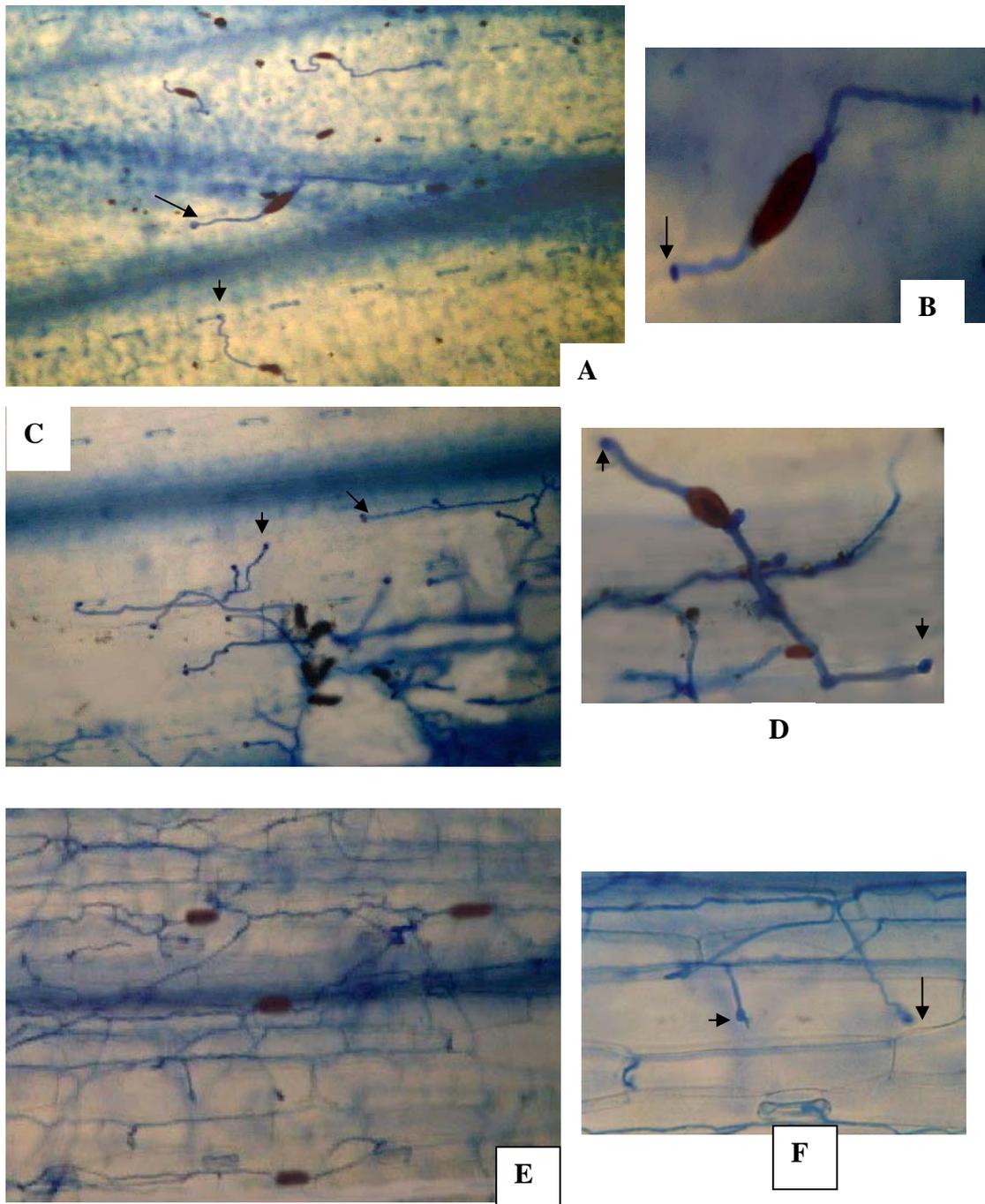


Figura 19: Aspecto das folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com goma xantana.

- (A, B) Folha tratada com 24h de intervalo de tempo entre goma e conídio.
 (A) Foto 100x de aumento (B) Foto 400x aumento
 (C, D) Folha tratada com 48h de intervalo de tempo entre goma e conídio.
 (C) Foto 100x de aumento (D) Foto 400x aumento
 (E, F) Folha tratada com 72h de intervalo de tempo entre goma e conídio.
 (E) Foto 100x de aumento (F) Foto 400x aumento

5.7.3. Indução de resistência com Alicina no Cultivar Embrapa 128

A Alicina é um dos elicitores observados por Rodrigues et al.,(2002), como sendo indutor de resistência em plantas de cevada. O intervalo de 72 horas foi o que apresentou 100% de proteção entretanto em 48 horas, apresentou acima de 90% de proteção. Os resultados obtidos no presente trabalho vieram de acordo com os obtidos por Rodrigues et al.,(2002) onde as plantas da cultivar Embrapa 128, apresentaram 100% de proteção em 72 horas entretanto, no intervalo de 48 horas com 93,6% e, com 24 horas 80,2%. Observou-se, que as lesões também se apresentaram de menor tamanho nos intervalos de 24 e 48 horas comparado com as plantas infectadas (Tabela 6).

Já nas folhas clarificadas, foi possível visualizar o número de conídios germinados, e não germinados demonstrando que, em plantas submetidas ao tratamento com alicina, existem conídios que germinam e aquelas que não germinam podendo até penetrar e causar lesão, mesmo que a porcentagem de proteção ocorra como visualizado em plantas com intervalo de 24 horas, onde alguns conídios ainda germinam e penetram (Tabela 7 e Figuras 20, 21 e 22).

Como em placa de petri a alicina não se mostrou fungitóxica para o fungo, a inibição de germinação pode estar ligada a algum fator que a planta possa estar liberando contra o fungo, impedindo a germinação.

5.7.4. Indução de resistência com Alicina no Cultivar Embrapa BRS 195

Para o cultivar Embrapa BRS 195, o intervalo de 72 horas e 48 horas apresentou 100% de proteção, entretanto no intervalo de 24 h, 80% de proteção. As lesões observadas também foram de menor tamanho, no intervalo de 24 horas comparado com as plantas infectadas (Tabela 6).

Já nas folhas clarificadas, foram visualizados o número de conídios germinados e não germinados, demonstrando que em plantas submetidas ao tratamento com alicina, existem conídios que germinam e aqueles que não germinam, podendo até ocorrer penetração e ocasionar a lesão, mesmo que a porcentagem de proteção ocorra como visualizado em plantas com intervalo de 24

horas, onde alguns conídios ainda germinam e penetram (Tabela 7 e Figura 21 e 22). Como em placa de Petri a alicina não se mostrou fungitóxica para o fungo, assim, a inibição de germinação pode estar ligada a algum fator que a planta possa estar liberando contra o fungo, impedindo a germinação.

Tabela 6: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada cultivar Embrapa 128 em Embrapa BRS 195 contra *Bipolaris sorokiniana*, utilizando alicina como indutor.

Tratamentos*	Embrapa	128
	folhas infectadas**	% Proteção***
Infectada	20	0 a
Alicina -24H	6	80,2 b
Alicina -48H	2	93,6 b
Alicina -72H	0	100 b
	Embrapa	BRS 195
Infectada	30	0 a
Alicina -24H	6	80 b
Alicina -48H	0	100 b
Alicina -72H	0	100 b

*Tratamentos: Infectada: plantas aspergidas com suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana*; Alicina – 24h: plantas aspergidas com alicina 24h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*; Alicina – 48h: plantas aspergidas com alicina 48h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*; Alicina – 72h: plantas aspergidas com alicina 72h antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*;

** Número de folhas infectadas representam média de um total de 10 plantas/tratamento.

***Porcentagem de proteção seguidas por letra b, são significativamente diferentes do controle (plantas infectadas) pelo teste T ($P < 0,05$).

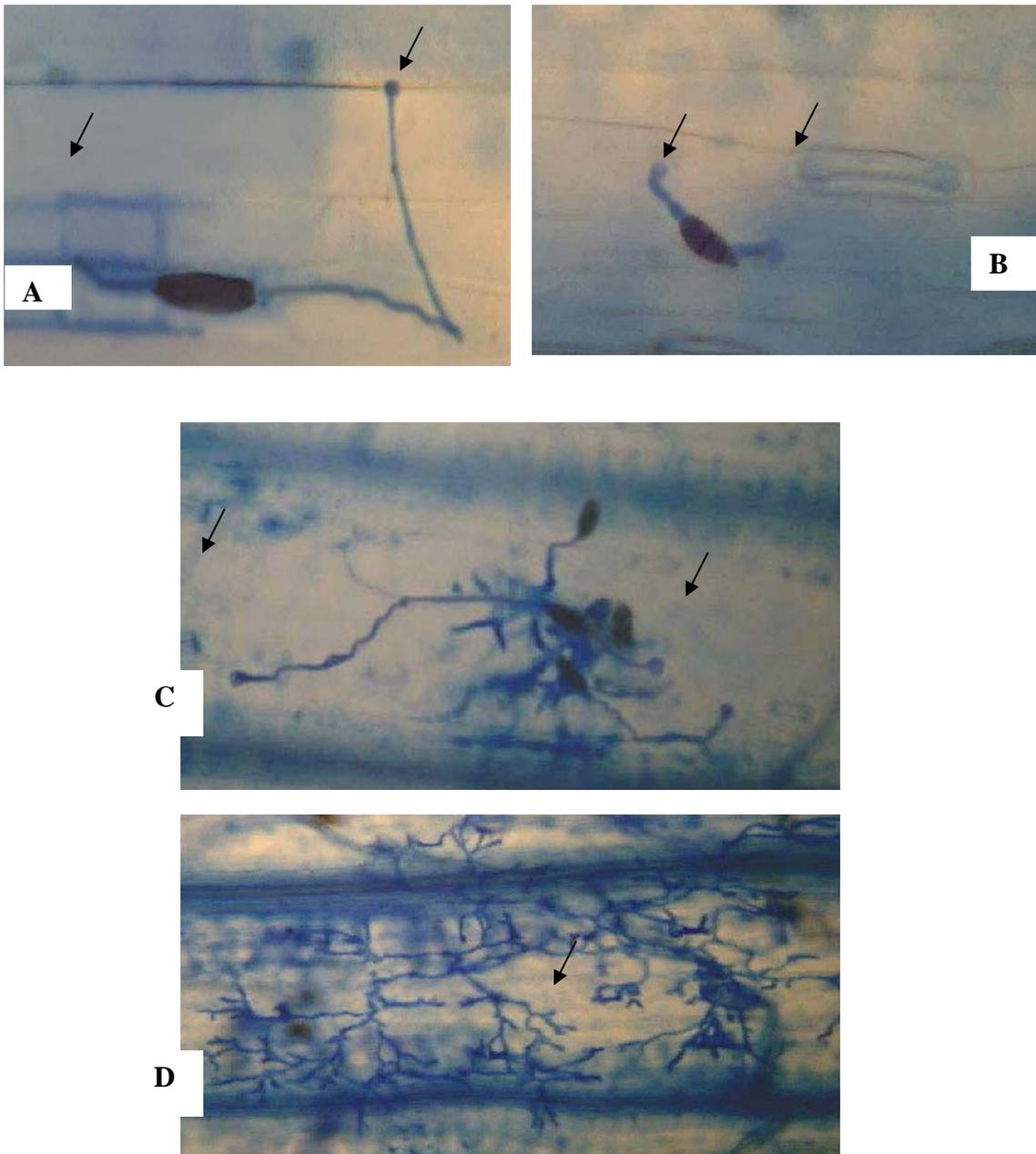


Figura 20: Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa 128 tratadas com alicina.

(A, B) folhas tratadas com alicina e após 24h com suspensão do fungo. Foto 400x de aumento

(C) folhas tratadas com alicina e após 48h com suspensão do fungo. Foto 100x de aumento.

(D) folhas tratadas com alicina e após 72h com suspensão do fungo. Foto 100x de aumento.

Setas indicam alguns dos apressórios formados e penetração ocorrendo no estômato da folha ou diretamente pela parede.

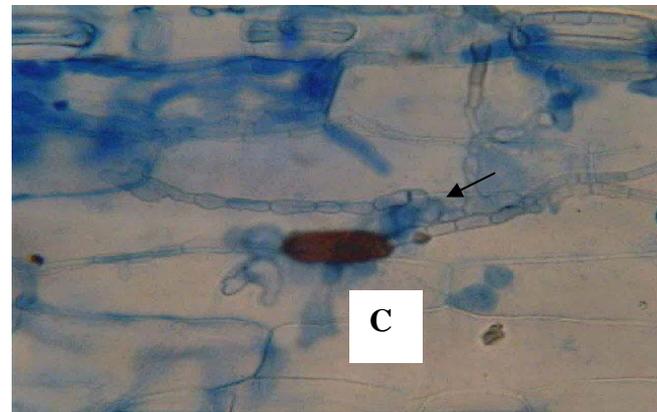
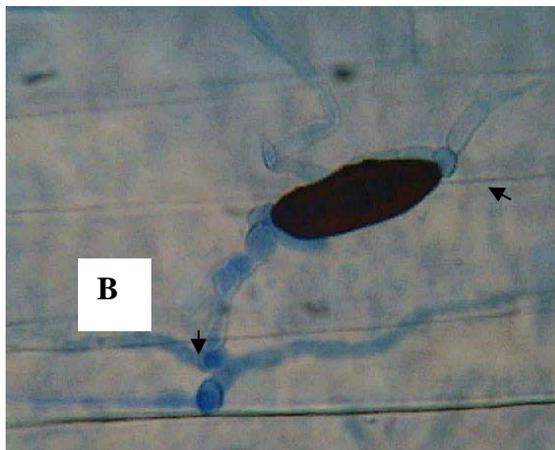
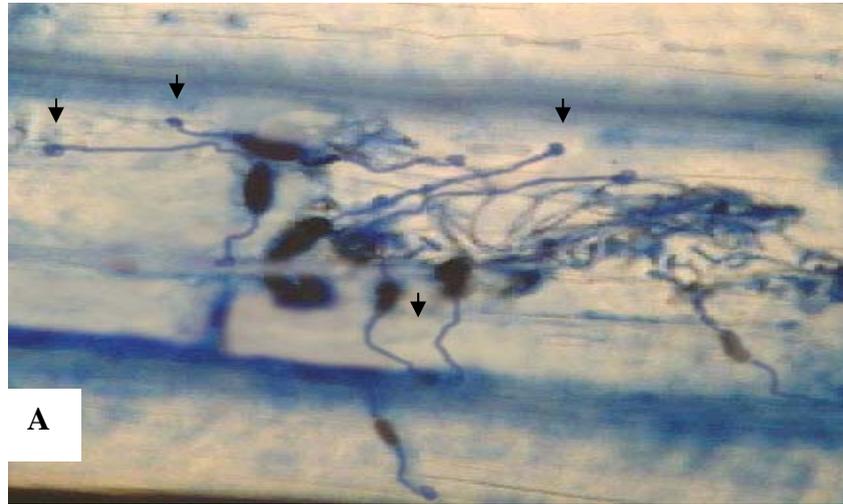


Figura 21: Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com alicina.

(A) Aspecto das folhas tratadas com alicina, e após 24h ou 48 h com suspensão do fungo. Foto 100x de aumento

(B) Aspecto de um conídio germinando formando apressório com penetração (24h de intervalo de tempo). Foto 200x de aumento.

(C) Aspecto de um conídio germinado formando apressório com penetração (48h de intervalo de tempo). Foto 400x de aumento.

Setas indicam alguns dos apressórios formados e penetração ocorrendo no estômato da folha ou diretamente pela parede.

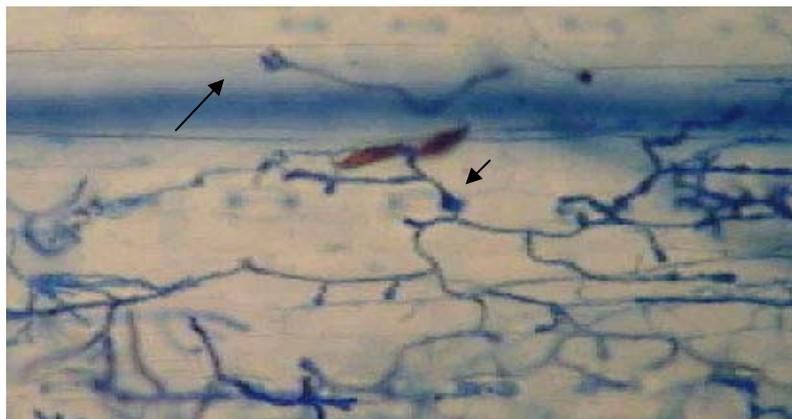


Figura 22: Amostras de folhas de cevada Cultivar Embrapa BRS 195 tratadas com alicina (72h de intervalo de tempo). Foto 100x. de aumento.

Setas indicam alguns dos apressórios formados e penetração ocorrendo no estômato da folha ou diretamente pela parede.

Tabela 7: Número de conídios germinados, não germinados, número de hifas e pontos de penetração de conídios de *Bipolaris sorokiniana* em folhas de cevada Embrapa 128 e Embrapa BRS 195.

Folhas de cevada	Número de conídios germinados *	Número de conídios não germinados*	% germinação	Apressórios e pontos de penetração
Embrapa 128	52	8	86,6%	Em vários pontos**
BRS 195	46	14	76,6	Em vários pontos**
Emb. 128				
G. x. 24h	37	23	61,6	64
G. x. 48h	40	20	66,6	74
G. x. 72h	38	22	68,3	72
BRS 195				
G. x. 24h	37	23	61,6	72
G. x. 48h	37	23	61,6	75
G. x. 72h	38	22	63,3	78
Emb.128				
Alicina 24h	39	11	65	78
Alicina 48h	40	10	66,6	74
Alicina 72h	40	10	66,6	75
BRS 195				
Alicina 24h	37	23	61,6	74
Alicina 48h	47	13	78,3	81
Alicina 72h	49	11	81,6	93

* número médio encontrado em 50 pedaços de folhas infectadas e total de 60 conídios.

** Impossível contagem devido ao grande número.

G. x.= Goma xantana; Emb.=Embrapa

5.8 OBSERVAÇÃO GERAL

As duas cultivares apresentaram proteção após aplicação dos indutores e, as mesmas folhas, após clarificadas, foram observados os conídios germinados com formação de apressórios bem como a penetração (Figura 10 e 11). Isto veio demonstrar que os elicitores utilizados foram responsáveis para enviar um sinal para as células e estas, responderam com a formação de outras macromoléculas responsáveis pela degradação do fungo. Assim, a resposta de defesa foi da planta e não como controle químico sobre o fungo.

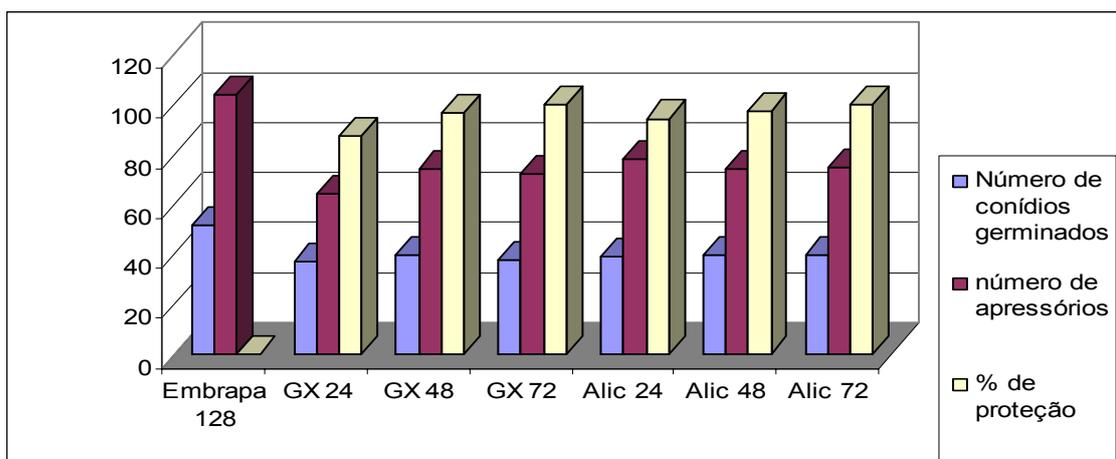


Figura 23: Número de conídios germinados, número de apressórios e % de proteção na cultivar Embrapa 128 quando tratadas com elicitor goma xantana (GX) ou alicina (Alic) nos diferentes intervalos de tempo.

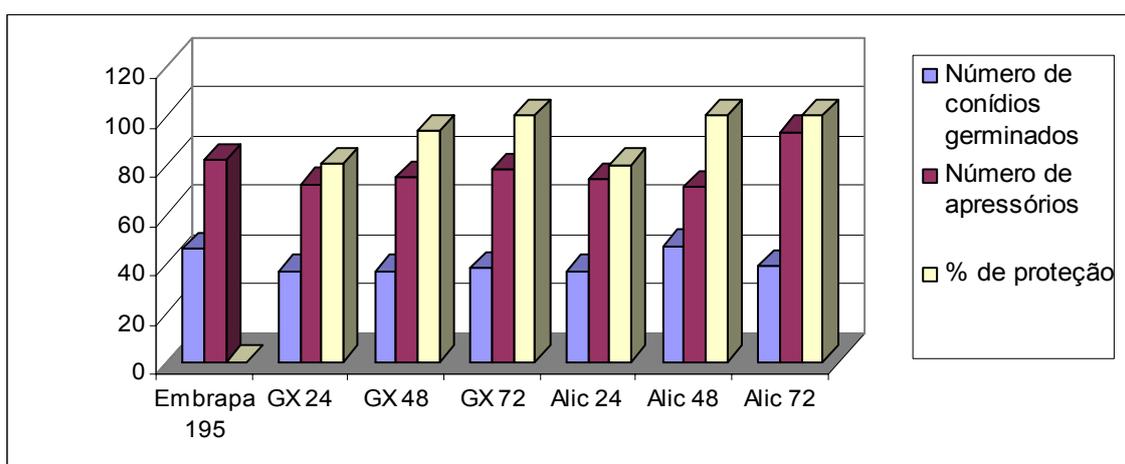


Figura 24: Número de conídios germinados, número de apressórios e % de proteção na cultivar Embrapa BRS 195 quando tratadas com elicitor goma xantana (GX) ou alicina (Alic) nos diferentes intervalos de tempo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões, a ultraestrutura de folha sadia, apresentou estômatos e cloroplastos bem definidos, não tendo diferença entre as cultivares Embrapa 128 e Embrapa BRS 195. O fungo *Bipolaris sorokiniana* teve germinação bipolar, estímulo tigmotático, penetração através do estômato e superfície foliar e, formação de apressórios.

Os elicitores goma xantana e alicina foram eficientes na indução de resistência demonstrando na superfície foliar nenhuma ação inibitória, mas sim que algum sinal de dentro da planta foi formado impedindo que o fungo continue o seu crescimento matando as células, por ser este fungo necrotrófico. Os indutores não apresentaram controle químico nem fungitóxico sobre patógeno, demonstrando que a planta conseguiu produzir substâncias que permitiram com que se defendesse do patógeno foliar.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Repetir os experimentos quanto ao tratamento foliar com indutores e procedendo cortes histológicos, com a finalidade de analisar a ultraestrutura da parte interna da folha, na tentativa de visualizar as estruturas fúngicas bem como avaliar a parte bioquímica ligada a histologia, para melhor entendimento dos mecanismos de proteção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. New York, Academic Press. 1997.

ALCORN, J. L. The taxonomy of *Helminthosporium* species. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, p.37-56, 1988.

ALMEIDA, J. A.; TORRENT, J.; BARRÓN, V. Cor de solos, formas de fósforo e adsorção de fosfatos em latossolos desenvolvidos de basalto do extremo-sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p.985-1002, 2003.

AMORIN, L. Ciclo primário e secundário. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Editora Ceres, São Paulo, p.234-245, 1995a.

AMORIN., L. Sobrevivência do Inóculo. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Editora Ceres, São Paulo, p.246- 267, 1995b.

AMORIN, L. Disseminação. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Editora Ceres, São Paulo, p.268-294, 1995c.

AMORIN, L. Infecção. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Editora Ceres, São Paulo, p.295-308, 1995d.

ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbiology Infection**, Paris, v. 2, p.125-129, 1999.

APOGA, D.; JANSON, H. B. Visualization and characterization of the extracellular matrix of *Bipolaris sorokiniana*. **Mycology Research**, United Kingdom, v. 104, p.564-575, 2000.

ÁRIAS, G. Melhoramiento genético y producción de cebada cervecera em América Del Sur. Roma, **FAO**. 1995.

BACH, E. E.; KIMATI, H.; PASCHOLATI, S. F. Aspectos bioquímicos nas interações trigo-*Bipolaris* spp. e *Drechslera tritici-repentis*. **Fitopatologia Brasileira**, Poços de Caldas, v. 22, p.247 (XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia), 1997.

BACH, E. E. Utilização da eletroforese no estudo de alterações enzimáticas na interação planta-patógeno. In: **Encontro sobre aplicações da eletroforese na agropecuária**, 1, Nova Odessa, SP, Instituto da Zootecnia, p.1-4, 1989.

BACH, E. E. Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris* spp. E *Drechslera tritici-repentis* do trigo: aspectos bioquímicos nas interações e indução de

resistência, 1987, 132 f. **Tese (Doutorado)** – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1997.

BACH, E. E. & KIMATI, H. Comparação morfológica e patogênica de *Exserohilum turcicum* isolado de milho, sorgo e capim-massambará. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p.134-139, 1995.

BACH, E. E. & KIMATI, H. Purification and characterization of toxins from wheat isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Venenous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 5, p.184-199, 1999.

BACH, E. E.; BARROS, B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivate conidia suspension. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p.411-418, 2003.

BARTINICK-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review Microbiology**, USA, v.22, p.87-108, 1968.

BERNARD, N. Remarques sur l'immunité chea les plantes. **Bulletin Institut Pasteur**, Paris, v. 7, p. 369, 1909.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H & AMORIM , L. **Manual de Fitopatologia, princípios e conceitos**. Editora Ceres, São Paulo,v. 1, 1995.

BERTOZZI, C & KIESSLING, L. L. Chemical glycobiology. **Science**. v.291, p.2357-2364, 2001.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance of Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, v.84, p.1432-1444, 1994.

BOLLER, T. Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In: KEY, J. L.; KOSUGE, T. S. (Eds.). **Cellular and molecular biology of Plant Stress**. Alan R. Liss, New York, p. 247-262, 1985.

BRAUN, E. J.; HOWARD, R. J. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. **Protoplasma**, v.181, p. 2002-212 , 1994.

BROWN, N. A. Experiments with paris daisy and rose to produce resistance to crown gall. **Phytopathology**, St. Paul. v. 13, p.87-99, 1923.

BUZI, A.; CHI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopatology**, v.152, p. 34-42, 2004.

CARMO, I. R.; SILVA, A. O.; RODRIGUES, E.; ANTONIAZZI, N.; BACH, E. E. Patogenicidade de isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana* em cultivares de cevada e trigo. **Conscientiae Saúde**. Revista de Departamento de Ciências da Saúde- Uninove, v. 2, p.11-17, 2003.

CASTRO, O. L. Uso da goma xantana e suspensão de conídios inativados pelo calor como indutores de resistência em cevada contra *Bipolaris sorokiniana*. **Tese de Doutorado**, UNESP-Araraquara, Biotecnologia, p.77, 2003.

CASTRO, O. L. & BACH, E. E. Increased production of -1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 165-169, 2004.

CASTRO, O. L.; ANTONIAZZI, N.; FERRARI, V. & BACH, E. E. Uso da goma xantana como indutor de resistência em plantas de cevada (variedades AF 94135 e EMBRAPA 128) contra *Bipolaris sorokiniana*. In: **XXI Reunião anual da pesquisa de cevada**, 2, 2001, Guarapuava. Anais e ata... Guarapuava, EMBRAPA, p.559-567, 2001.

CAVALLITO, C.; BAILEY, J.H. Allicin, the antibacterial principle of allium sativum. Isolation, physical, properties and antibacterial action. **Journal American Chemistry Society**, Washington, v. 66, p. 1944-1952, 1944.

CELLINI, L.; DI CAMPLI, E.; MASULLI, M.; DI BARTOLOMEO; S.; ALLOCATI, N. Inhibition of Helicobacter pylori by garlic extract (*Allium sativum*), **FEMS Immunology Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 13, p.273-277, 1996.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Chemical Review Biology**, New York, v. 8, p.129-154, 1933.

CLAY, R. P.; ENKERLI, J. & FULLER, M. S. Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria. **Protoplasma**, v. 178, p.34-47, 1994.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, p.79–89, 2004.

DANN, E. K.; MEUWLY, P.; METRAUX, J. P.; DEVERALL, B. J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinases and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.307-319, 1996.

DAVIS, S. R. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products – the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. **Mycoses**, v. 48, p.95–100, 2005.

D'ELANO-FRIER, J. P.; MARTINEZ-GALLARDO, N. A.; MARTINEZ-DE LA VEGA, P.; SALAS-ARAIZA, M. D.; BARBOSA-JARAMILLO, E. R.; TORRES, A.; VARGAS, P.; BORODANENKO, A. The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p.1001-1034, 2004.

DEVERAL, B. J.; SMITH, I.; MAKRI, S. Disease resistance in vicia faba and *Phaseolus vulgaris*. Netherlands, **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 74, p.137-148, 1968.

DE VRIES, R.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews**, Netherlands, p.497-522, 2001.

DOLAN, T. E.; COHEN, Y.; COFFEY, M. D. Protection of Persea species against *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by prior inoculation with a citrus isolate of *P. parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul., v. 76, p.194-196, 1986.

EBRAHIM-NESBAT, F. & SCHOENBECK, F. Further electron microscopical studies induced resistance of barley against *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlim, v. 113, p.219-230, 1985.

ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Induced resistance to anthracnose at a distance from the site the inducing interaction. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p.1110-1112, 1971.

ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Protection of beans against anthracnose by *Colletotrichum* species nonpathogenic on bean. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v. 86, p.117-126, 1976a.

ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. A comparative study of the development of compatible, incompatible and induced interactions between *Colletotrichum* species and *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v. 87, p.289-303, 1976b.

ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Effect of heat-treatment on the resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v. 88, p. 43-52, 1976c.

ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Relation of phitoalexin accumulation to local and systemic protection of bean against anthracnose. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v. 89, p.114-130, 1977.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. John Willey and Sons, New York, 3 ed, 1976.

FELIPE, T.A. Indução de resistência em plantas de cevada utilizando o extrato de manjeriço contra *Bipolaris sorokiniana*. **Dissertação de mestrado UMC-Biotecnologia**, 2005, 74p.

FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo, SP, EDUSP, 1979, 350p.

FORCELINI, C. A. Trigo – a importância do tratamento de sementes. **Correio Agropecuário**, São Paulo, v.1, p. 2-5, 1991.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.-H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v. 8, p.629-643, 1996.

GOTTSTEIN, H. D. & KUC, J. The induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**. Saint Paul, v.79, p.271-245, 1989.

GOZZO, F. Systemic Acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p.4487-4503, 2003.

GUZZO, S. D.; BACH, E. E.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W.B.C. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.139, p.119-128, 1993.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p.449-454, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.55, p.77-84, 1999a.

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

HEALE, J. B. & SHARMAN, S. Induced resistance to *Botrytis cinerea* in root slices and tissue culture of carrots (*Daucus carota* L.). **Physiological Plant Pathology**, London, v. 10, p.51-61, 1977.

HOFGAARD, I. S.; ERGON, Å.; WANNER, L. A. & TRONSMO, A. M.. The Effect of Chitosan and Bion on Resistance to Pink Snow Mould in Perennial Ryegrass and Winter Wheat. **Journal of Phytopathology** , v. 153 , p.108-119, 2004.

HUGHES, S. J. Conidiophores, conidia and classification. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.31, p.577-659, 1953.

HUTCHESON, S. W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**. v. 36, p.59-90, 1998.

HWANG, B. K.; SUNWOO, J.; KIM, Y. J.; KIM, B. S. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butiric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, New York, v. 51, p.305-322, 1997.

JANSON, H. B.; ÅKESSON, H. Extra cellular matrix, esterase and the phytoxin prehelmentosporol in infection of barley leaves by *Bipolaris sorokiniana*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 109, p.599-605, 2003.

JONKERS, D.; VAN DEN BROEK, E.; VAN DOOREN, I.; THIJS, D.; DORANT, E.; HAGEMAN, G.; STOBBERINGH, E. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p.837-839, 1999.

KARN, J. F. & KRUPINSKY, J. M. Chemical composition of interaction wheatgrass affected by foliar diseases and stem smut. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, p.1152-1155, 1983.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; OOSTENDORP, M.; RYALS, J. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 100, p.359, 1994.

KIM, C.; BLEE, K. A.; ROBINS, J.; ANDERSON, A. J. Oxycom TM under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.129-136, 2001.

KOGANEZAWA, H.; SATO, T.; SASAYA, T. Effects of probenazole and saccharin in symptom appearance of tobacco mosaic virus in tobacco. **Annals of Phytopathological Society of Japan**. v. 64, p.80-84, 1998.

KOTHARI, I.L.; PATEL, M. Plant immunization. **Indian Journal Experimental Biology**, v.42, p.244-52. 2004.

KUC, J.; SCHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 7, p.195-199, 1975.

KUC, J. Systemic induced resistance. In: WALTERS, D. R.; SCHOLLES, J. F.; BRYSON, R. J.; PAUL, N. D.; MICROBERTS, N. (Ed) Aspects of applied biology: physiological responses of plants to pathogens. Dundee: **Association of Applied Biologists**, v. 42, p.235-242, 1995.

KUC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants, **Crop Protection**, Kentucky, v.19, p.859-861, 2000.

KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet, k. (ed). **Innovative approaches to plant disease control**. New York, John Wiley & Sonns, p.255-274, 1987.

KUC, J. Induced immunity to plant disease. **BioScience**, v. 32, p.854-60. 1982.

KUMAR, J; SCHAFER, P ; HUCKELHOVEN; LANGEN G.; BALTRUSCHAT, H; STEIN E.; NAGARAJAN S.;KOGEL K. H; *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, v 3, p.185-195, 2002

KUTSNER, B.; HELLWALD, K. H.; BUCHENAUER, H. Systemic induction of resistance in *Phaseolus vulgaris* L., to tobacco necrosis virus (TNV) by *Uromyces phaseoli* (Pres). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 138, p.9-20, 1993.

LARGE, E. C. Growth stages in cereal: Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, New York, v. 3, p.129, 1954.

LAWSON, L.D. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: KOCH, H.P.; LAWSON, L.D. (eds). **Garlic: the science therapeutic application of Allium sativum L.**, Willians and Wilkins, Baltimore, p.37-108, 1996.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PACHOLATI, S. F.; LAMBIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revista Anual Patologia de Plantas** V. 5, p.235-80. 1997.

LEITE, B.; ISHIDA, M.L.; ALVES, E.; PASCHOLATI, S.F. & SUGUI, J.A. Detection of calcium in the adhesive material obtained from the plant pathogen *Colletotrichum graminicola*: X ray microanalysis (EDS) evidences. **Proceedings Microscopy Microanalysis** v.6, p.698-699, 2000.

LUZ, W. C. Diagnose das principais doenças da cevada no Brasil. Passo Fundo: **EMBRAPA-CNPT**, p. 24, (EMBRAPA-CNPT. Circular Técnica 2), 1982.

MASSABNI, A. C.; CORBI, P. P.; CAVICCHIOLI, M.; CUIN, A. A química do alho. **Revista de Oxidologia**, p.13-16, set./out. 1998.

MATHRE, D. E. **Compendium of barley diseases**. 2 ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1985, 78p.

MERCURE, E.W.; KUNOH, H. & NICHOLSON, R.L.. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Physiological Molecular Plant Pathology**, v. 45, p.412-40, 1994a.

MERCURE, E.W.; LEITE, B.; NICHOLSON, R.L.. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia to artificial hydrophobic surfaces. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** V. 45, p.421-40, 1994b.

MERCURE, E.W.; KUNOH, H. & NICHOLSON, R.L.. Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, v. 46, p.121-35, 1995.

MESQUITA, M. A. IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DA CERVEJA NO Brasil. Anais e Ata da **XXV Reunião Anual de Pesquisa de cevada**. EMBRAPA, Guarapuava, 12-13 de abril de 2005, p.15-19, 2005.

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

MINELLA, E. SILVA, M. S.; ÁRIAS, G. Potencial de rendimento e características agrônômicas dos cultivares de cevada cervejeira recomendada para região Sul do Brasil. **Circular Técnica**. Passo Fundo-RS: Embrapa-Trigo, 1996.

MINELLA, E. Desafios e potencialidades do melhoramento genético de cevada no Brasil. In: **XXI Reunião Anual da Pesquisa de Cevada**, 2., 2001.; Anais a ata...; Embrapa, p.31-40, 2001.

MINELLA, E. Começa a colheita da cevada. Via Trigo (**Informativo do Centro Nacional de Pesquisa em trigo**). Ano 1, n.7 (28 de setembro de 2004), Passo fundo, RS., 2004.

MIRON T., RABINKOV A., MIRELMAN D., WEINER L., WILCHEK M.. A spectrophotometric assay for Allicin and Aliinase activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. **Analytical biochemistry**, v.265 , p. 317-325, 1998.

MIRON T.; RABINKOV A.; MIRELMAN D.; WEINER L.; WILCHEK M. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. **Biochemistry Biophysical Acta**. v.1463, p.20-30, 2000.

MOLINA, A.; HUNT, D. M.; RYALS, J. A. Impaired fungicides activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. **The Plant Cell.**, v.10, p.1903-1914, 1998.

MORAES, M. G. Mecanismo da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 6, p.261-284, 1998.

MORAES, W. Bioquímica de la resistência: um control alternative de la roya del café. In: Becker-Raternik, S.; Moraes, W. B. C.; Quinajico, M. (Ed.) **La Roya Del café conocimiento y control**. DSE-GTZ, Alemanha, p.65-187, 1991.

MOURA, J. A. B. O controle das principais doenças no trigo. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 2, p.712-715, 1987.

MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R.M.C.; RIBEIRO-NESIO, M. L. Taxonomia de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, p.211-223, 1988.

NICHOLSON, R. L. Adhesion of fungal propagules. **Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions**. Ed. M. Nicole & V. Gianinazzi-Pearson, p.117–134, 1996.

NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. & ASQUITH, T.N. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for the survival and virulence of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 72, p. 315-18, 1986.

NICHOLSON, R.L.; KUNOH, H. Early Interactions, adhesion and establishment of infection court by *Erysiphe graminis* **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p.609-15, 1995.

NICHOLSON, R.L. & MORAES, W.B.C.. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, p.255-61,1980.

OLIVEIRA, A. M. R. & BAIER, A. C. Qualidade industrial e resistência à helmintosporiose e à fusariose em triticales, trigo e centeio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p.603-608, 1993.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRITRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.19-28, 2001.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC, J. Association of β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Pathology**, v. 39, p.25-39, 1991.

PASCHOLATI, S. F.; MORAES, W. B. C.; FIQUEIREDO, M. B.; RODRIGUES, A. R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculations with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. **Fitopatologia brasileira**, Brasilia, v. 11, p.507-514, 1986.

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D. & NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological Molecular Plant Pathology**. V. 42, p.37-51, 1993.

PELTONEN, S.; MANNONEN, L.; KARJALAINEN, R. Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley suspension cultures. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v. 50, p.185-193, 1997.

PICININI, E. C. & FERNANDES, J. M. C. Avaliação de fungicidas no controle de doenças da parte aérea da cultura de cevada cervejeira – ensaio dos anos de 1999 e 2000. In: **Reunião Anual de pesquisa de cevada, Guarapuava. Anais e ata...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, v. 21, p.521-530, 2001.

RAY, J. Cultures et formes atténuées des maladies cryptogamiques des végétaux. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Sciences de L'Academie des Sciences**, Paris, v. 133, p. 307-309, 1901.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**, Ed. Guanabara-Koogan, , Rio de Janeiro, 1996, p 728.

REIS, E. M. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. São Paulo, SP. **CNDA**. 1987.

REIS, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PICININI, E. C. **Estratégia para o controle de doenças do trigo**. Passo Fundo: **Embrapa – CNPT**, 50 p., 1988.

REUVENI, R. & BOTHMA, C. G. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaeroteca fuliginea* in melons. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v.114, p.260-276, 1985.

RODRIGUES, E. L.; MILANEZ, A.; BACH, E. E. Utilização da alicina como indutor de resistência em plantas de cevada (variedade EMBRAPA 128) contra *Bipolaris sorokiniana*. In: **Reunião Anual da Pesquisa de cevada**, 22. 2002, Passo Fundo. Anais e ata... Passo Fundo: Embrapa Trigo, p.519-530. 2002.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v. 14, p.340-58. 1961.

SANTOS, H. P.; REIS, E. M.; LHAMBY, J. C.; WOBETO, C. Efeito da rotação de culturas sobre o trigo, em sistema plantio direto, em, PR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p.259-267, 1996.

SCHRODER, M.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E. Temporal and spatial patterns of β -1,3-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Plant Journal**, v. 2, p.161-172, 1992.

SEQUEIRA, I. The acquisition of systemic resistance by prior inoculation. In: Daly, J. M. & Uritani, I. **Recognition and specificity in plant host-parasite interactions**. p.231-251, 1979.

SEQUEIRA, L. Mechanisms of induced resistance in plants. **Annual Review Microbiology**, London, v. 37, p.51-79, 1983.

SHOEMAKER, R. A. Nomenclature of *Drechslera teres* and *Bipolaris sorokiniana* grass parasites segregated from "*Helminthosporium*". **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 37, p.879-887, 1959.

SILVA, A.A.O. Efeitos do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) em plantas de cevada embrapa 128 contra *Bipolaris sorokiniana*. **Dissertação de mestrado UMC-Biotecnologia**, 2005,60p.

SILVA, M. S. & MINELLA, E. Sterility in brazilian malting barley cultivar and lines. In: SCOLES, G. ROSSNAGEL, B.; FAIBAIRN, C. (eds.). Barley Genetics VII. Saskatoon, **Proceedings 5th International Oat Conference and 7th International Barley Genetics Symposium**, Poster Sessions. Saskatoon-SK, Canada, University of Saskatchewan, University Extension Press. 1996.

SMALL, V., BAILEY J.H., CAVALLITO, C. J. Alkyl thiosulfinates **Journal American Chemical Society**, v. 69, p.1710-1713, 1947.

SMITH, E. F. **Bacteria in relation to plant diseases**. Washington, Carnigie Institution of Washington, v. 2, 1911.

STOLL, A.; SEEBECK, E. Die synthesis des naturlichen Allins und seiner drei optisch aktiven isomerasen. **Helvetica Chimica Acta, Germany**, v. 31, p.189, 1948.

SRIVASTAVA, S. K. A. Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid. And their implication in disease resistance. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.120, p.249-254, 1987.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p.235-270, 1997.

SUGUI, J.A. Estudo das matrizes extracelulares secretadas pelos fungos *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum graminicola* e *Pestalotiamalicola*. Universidade Federal do Paraná – **Tese de Doutorado**, 1998.

SUGUI, J.A.; LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. Characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. **Physiological Molecular Plant Pathology**. V. 52, p.411-425, 1998.

TOLEDO, J.; REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. Efeitos do substrato na morfologia dos conídios de *Bipolaris sorokiniana* e da densidade do inoculo na intensidade da mancha marrom em cevada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.5-10, 2004.

TOMIYAMA, K.; DALY, J.M.; URITANI, I.; OKU, H.; OUCHI, S. **Biochemistry and cytology of Plant-parasite interaction**. Edit. Elsevier, New York, 1976, 256p.

TONON, J. Cevada: As principais doenças fúngicas. **Correio Agrícola**, São Paulo, p.12-15, 1992.

TURQUETI, A. A.; NONOHAY, J. S.; MATSUMURA, A. T.; WINGE, H. Testes in vitro de antagonismo entre *Trichoderma* sp. e *Bipolaris sorokiniana* da cevada. In: **XXI Reunião anual da pesquisa de cevada**, 2, 2001,. Anais e ata...: EMBRAPA, p.457-463, 2001.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 36, p.453-483, 1998.

VIEIRA, J. C. Microflora da semente de cevada (cultivares Antártica 04 e FM 4004) e influência de sementes manchadas (cv. FM 404) na qualidade do malte. 77 f. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.

WHITE, R. F. Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, v. 99, p.410-412, 1979.

YAMADA, Y.; AZUMA, K. Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. **Antimicrobial Agents Chemotheraphie**, Washington, v. 11, p.743-749, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)