

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
SILVIO DANTAS**

**EFEITO DO EXTRATO DO COGUMELO
Agaricus sylvaticus NO CONTROLE DE DOENÇAS
EM PLANTAS DE CEVADA CONTRA *Bipolaris sorokiniana***

**Mogi das Cruzes, SP
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
SILVIO DANTAS**

**EFEITO DO EXTRATO DO COGUMELO
Agaricus sylvaticus NO CONTROLE DE DOENÇAS
EM PLANTAS DE CEVADA CONTRA *Bipolaris sorokiniana***

**Dissertação apresentada à Universidade de
Mogi das Cruzes, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.**

Área de Concentração: Biológica

Prof^a Orientadora: Dra. Erna Elisabeth Bach

**Mogi das Cruzes, SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Dantas, Silvio

Efeito do extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* no controle de doenças em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana* / Silvio Dantas. -- 2006.

69 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. Indutor de resistência 2. *Agaricus sylvaticus* 3.
Cevada – Doenças 4. *Bipolaris sorokiniana* 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 catorze horas do dia cinco de junho de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação “Efeito do Extrato do Cogumelo *Agaricus sylvaticus* no Controle de Doenças em Plantas de Cevada contra *Bipolaris sorokiniana*” para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Silvio Dantas**. 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 Elisabeth Bach e Nilsa Sumie Yamashita Wadt da Universidade de Mogi das Cruzes e Eliana Rodrigues da UNINOVE, 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/maioria)

Mogi das Cruzes, 05 de junho de 2006

Comissão Examinadora

Erna Elisabeth Bach
Prof.ª Dr.ª Erna Elisabeth Bach

Nilsa Sumie Yamashita Wadt
Prof.ª Dr.ª Nilsa Sumie Y. Wadt

Eliana Rodrigues
Prof.ª Dr.ª Eliana Rodrigues

Julgamento

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que nos deu a vida e permite que façamos dela nossas grandes obras.

Dedico também à minha orientadora, pela ajuda e ensinamentos transmitidos.

À minha esposa Cláudia, pelo incentivo e paciência.

E aos meus familiares que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Erna Elisabeth Bach, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, pela orientação, acompanhamento, dedicação, paciência e amizade.

À UMC pela oportunidade da realização do curso.

Aos meus amigos que muito colaboraram nos experimentos:

Alerrandro dos Santos Carvalho

Andréia Aparecida de Oliveira Silva

Carlos Hermann

A Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), pela utilização dos laboratórios, equipamentos e materiais.

A minha família, pelo apoio, incentivo e carinho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

E a Deus, por me oferecer saúde e disposição nos momentos mais difíceis nesta conquista.

RESUMO

A mancha foliar causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem., vem atacando as culturas de cevada, causando prejuízos aos produtores e as indústrias cervejeiras. Para o controle da doença, o mais utilizado pelos produtores tem sido o tratamento com fungicidas podendo provocar riscos para o meio ambiente e para a saúde do homem. Visando eliminar estes inconvenientes, preconiza-se a utilização de indutores de resistência. O objetivo do presente trabalho foi verificar a possibilidade da utilização do extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* em promover a indução de resistência em plantas de cevada das variedades Embrapa 128 e Embrapa 195. Para isto, foram preparados lotes de plantas envolvendo as duas variedades de cevada. Em todos os tratamentos foram aspergidos cerca de 10mL da suspensão na concentração de 10^5 conídios/mL, e ou solução do extrato (indutor) ou ainda água em grupos de 10 plantas cada e com 3 repetições. Os tratamentos para indução foram: a- sadia (plantas aspergidas com água); b- tratadas com indutor (plantas aspergidas com extrato); c- inoculadas com os patógenos (plantas aspergidas com suspensões dos isolados); d- tratadas com indutor e após 24 h inoculadas com a suspensão de conídios ; e- idem ao grupo d, entretanto, após 48 horas; f- idem ao grupo d, entretanto, após 72 horas; g- Sist 1T = pinceladas as primeiras folhas com 2mL do extrato e após 24, 48 e 72h com suspensão de conídios; h- Sist 2 T = pinceladas as segundas folhas com 2mL do extrato e após 24, 48 e 72h com suspensão de conídios. A proteção das plantas foi avaliada 04 dias após a inoculação do patógeno. Os resultados oriundos dos tratamentos com o extrato de *Agaricus sylvaticus* na concentração de 1,2mg de proteína, demonstraram proteção local nas duas cultivares de cevada, apresentando uma porcentagem de proteção entre 70 a 85%, aumentando em função do tempo (24, 48 e 72 horas), entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno. Em relação à proteção sistêmica, na variedade Embrapa 128, os resultados demonstraram proteção tanto para a fase ascendente como na descendente. Quanto às análises bioquímicas foi possível visualizar aumento nas concentrações de proteínas, enzimas β -1,3-glucanase e esterase nas plantas tratadas e, decréscimo de fenóis isto quando comparadas com plantas infectadas. Isto indicou que o extrato de *Agaricus sylvaticus* demonstrou ser um indutor de resistência.

Palavras-chave: Indutor de resistência, cevada, *Bipolaris sorokiniana*, *Agaricus sylvaticus*.

ABSTRACT

Foliar diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem., was attacking the barley cultures, causing damages to the producers and to brewers industry. For disease control, producers were used for treatment fungicides that could provoke risks in the environment and cause problems in man's health. Seeking to eliminate these inconveniences, the use of elicitors of resistance inducers is sought. The objective of the present work was to verify the possibility of the use of fungi extract (*Agaricus sylvaticus*) in promoting the resistance induction in barley plants (varieties Embrapa 128 and Embrapa 195). For this, lots of plants were prepared involving two barley varieties. In all the treatments were sprinkled about 10mL of the suspension in the concentration of 10^5 conidia/mL and or solution of the extract (elicitor) or still water in groups of 10 plants each with 3 repetitions. The treatments for induction were: a- healthy (plants sprinkled with water); b- treated with inducer (plants sprinkled with extract); c- inoculated with pathogen (plants sprinkled with suspensions of the isolated); d- treated with inducer and after 24 h inoculated with conidia suspension; e- same to the group d, however, after 48 hours; f- same to the group d, however, after 72 hours; g-Sist 1T = brushstrokes the first leaves with 2mL of extract and after 24, 48 and 72 hours with conidia suspension; h- Sist 2 T = brushstrokes the second leaf with 2mL of the extract and after 24, 48 and 72 hours with conidia suspension. The protection of the plants was evaluated 4 days after the inoculation of pathogen. The results using extract of *Agaricus sylvaticus* in the concentration of 1,2mg of protein, demonstrated local protection in the two cultivars of barley and that presenting among 70 to 85% of protection, increasing in function of the time (24, 48 and 72 hours). In relation to systemic protection, variety Embrapa 128, the results demonstrated protection more in phase ascending than descendant. With relationship to the biochemical analyses was possible to visualize that concentrations of proteins, enzymes β -1,3-glucanase and esterase, were increased in the treated plants and a decreased of phenols when compared with infected plants. This came to indicate that extract of *Agaricus sylvaticus* demonstrated a inducer of resistance.

Key-words: Inducer of resistance, barley, *Bipolaris sorokiniana*, *Agaricus sylvaticus*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 contra o isolado <i>Bipolaris sorokiniana</i> , utilizando extrato do cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i>	37
TABELA 2-	Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 e 195 contra o isolado <i>Bipolaris sorokiniana</i> , utilizando extrato do cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i>	39
TABELA 3-	Porcentagem de proteção sistêmica em plantas de cevada tratadas com indutor extrato de cogumelo.....	42
TABELA 4-	Porcentagem de proteção nos diferentes tratamentos para a verificação da atuação do fungicida ópera.....	48
TABELA 5-	Quantidade de proteínas, de enzima beta-1-3-gluconase e de fenóis presentes nos extratos foliares de plantas de cevada, submetidas aos diferentes tratamentos com o fungicida ópera.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Escala de Feeks-Large (LARGE, 1954).....	17
FIGURA 2-	a) Aspecto do cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i> desenvolvido no solo em Tapiraí, b) colheita, c) <i>Agaricus sylvaticus</i> selecionados, d) lavagem dos cogumelos selecionados, e) secagem (desidratação), f) preparação do extrato de cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i>	30
FIGURA 3-	Desenvolvimento do isolado de <i>Bipolaris sorokiniana</i> em meio de cultura de BAD incorporado com extrato de cogumelo e, comparado com meio de BAD. Contagem: número de conídios.....	36
FIGURA 4-	Plantas infectadas com o patógeno ; Plantas tratadas com extrato de cogumelo 24 horas antes do patógeno.	38
FIGURA 5-	Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 e 195 contra o isolado <i>Bipolaris sorokiniana</i> , utilizando extrato do cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i> , nos diferentes intervalos de tempo.....	40
FIGURA 6-	Aspecto visual das folhas de cevada cultivares Embrapa 128 e 195 oriundas dos tratamentos.....	41
FIGURA 7-	Porcentagem de proteção em folhas de cevada submetidas a tratamento com extrato de cogumelo.....	42
FIGURA 8-	Aspecto visual das folhas de cevada submetidas a tratamento sistêmico.....	43
FIGURA 9-	Quantidade de proteínas em mg de SAB (soro albumina bovina) presente em folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra <i>Bipolaris sorokiniana</i>	44
FIGURA 10-	Atividade da beta glucanase presente em folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra <i>Bipolaris sorokiniana</i>	45
FIGURA 11-	Concentração de fenol, baseado em mg de ácido clorogênico, presentes em extrato de folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra <i>Bipolaris sorokiniana</i>	45
FIGURA 12-	Comparação das cultivares em relação a atividade da beta glucanase e a concentração de fenóis (ácido clorogênico) presentes nas plantas de cevada sadias, controles e tratadas com extrato do cogumelo.....	46
FIGURA 13-	Quantificação de proteínas, fenóis e atividade beta-glucanase de plantas de cevada tratadas sistemicamente com extrato de cogumelo.....	47

FIGURA 14-	Eletoforese de isoenzimas de esterase das variedades Embrapa 128 e 195, nos diferentes intervalos de tempo.....	50
FIGURA 15-	Eletoforese de isoenzima de esterase da variedade Embrapa 128 com os tratamentos sistêmicos, nos diferentes intervalos de tempo.....	51
FIGURA 16-	Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 128) submetidas aos tratamentos.....	52
FIGURA 17-	Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 195) submetidas aos tratamentos.....	53
FIGURA 18-	Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 128) submetidas aos tratamentos sistêmicos.....	54

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Revisão Bibliográfica.....	14
	2.1 A cevada.....	14
	2.2 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	15
	2.3 Indução de resistência.....	17
	2.3.1 Respostas de Defesa.....	22
	2.3.2 Compostos com Possíveis Funções de sinais.....	24
	2.3.3 ISR & SAR e suas Rotas Metabólicas.....	25
	2.4 Os Cogumelos.....	27
	2.4.1 O Cogumelo <i>Agaricus sylvaticus</i>	28
3	Materiais e Métodos.....	30
	3.1 Preparo do extrato de <i>Agaricus sylvaticus</i>	30
	3.2 Preparação do Isolado.....	31
	3.3 Teste Biológico do Extrato.....	31
	3.4 Sementes.....	32
	3.5 Preparação das Plantas para Ensaio Prévio do Extrato.....	32
	3.6 Tratamento de Indução Local.....	33
	3.7 Tratamento de Indução Sistêmico.....	33
	3.8 Efeito do fungicida Ópera.....	34
	3.9 Análises Bioquímicas.....	35
	3.10 Análise Eletroforética.....	35
	3.11 Análise estatística.....	36

4	Resultados e Discussão.....	36
4.1	Extrato de Cogumelo.....	36
4.2	Ensaio Prévios da Concentração do Indutor.....	37
4.3	Tratamentos com Indução Local.....	38
4.4	Indução de Proteção Sistêmica	41
4.5	Análises bioquímicas	43
4.5.1	Indução de Proteção Local.....	44
4.5.2	Indução de Proteção Sistêmica.....	47
4.6	Tratamento das Plantas com Ópera.....	48
4.7	Eletroforese das Plantas Tratadas.....	50
5	Conclusões.....	55
.	Referências.....	56

1 INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo, graças à sua grande adaptabilidade ambiental, bem como à sua utilização alimentar, em especial na produção de malte para indústria cervejeira. No Brasil, a cevada é cultivada quase que exclusivamente para fins cervejeiros, cujo cultivo está concentrado nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que apresentam áreas com características ecológicas semelhantes e propícias para esta atividade.

Várias doenças que atacam as culturas de cevada são causadas por fungos, como *Blumeria graminis hordei*, *Puccinia hordei*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera teres* entre outras. O fungo *Bipolaris sorokiniana* é o causador de uma das mais sérias doenças da cultura de cevada denominada mancha foliar.

Para o controle destas doenças diversas medidas vêm sendo praticadas, das quais a mais utilizada pelos produtores tem sido o tratamento com fungicidas. Contudo os riscos para o meio ambiente e para a saúde do homem são bastante conhecidos e difundidos. Visando eliminar estes inconvenientes, um dos métodos preconizados têm sido o da utilização de indutores de resistência. A indução de resistência tem sido observada em várias plantas em resposta ao tratamento prévio do hospedeiro com agentes bióticos ou abióticos, denominados elicitores ou indutores de resistência.

Muitos estudos dentro da área médica mostraram resultados positivos na utilização do cogumelo *Agaricus sylvaticus* no combate a patógenos humanos, e também na ativação do sistema imunológico e na melhoria de problemas de saúde como hipocolesterolêmico, anti-trombótico, entre outros. Dentre as substâncias ativas, os polissacarídeos, como as beta-glucanas, os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas, são os principais responsáveis pelo aumento da resistência do hospedeiro contra vários tipos de cânceres e doenças infecciosas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações obtidas do extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* em patossistemas agrícolas, visando o controle de moléstias de interesse econômico como a mancha foliar nas plantas de cevada, nas variedades Embrapa 128 e Embrapa 195, contra *Bipolaris sorokiniana*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cevada

A cevada, *Hordeum vulgare* L., tem sua origem no Oriente Médio, denominada “Fertile Crescent”, abrangendo Israel, Jordânia, Síria, Turquia, Iraque e Irã. A forma cultivada originou-se da espécie selvagem *Hordeum spontaneum* reclassificada atualmente como *Hordeum vulgare* sp. *vulgare*. As sementes foram levadas à Grécia, Etiópia e China e por apresentar grande adaptabilidade ecológica, a cevada atingiu boa parte do planeta (MINELLA, 2001).

No Brasil a cultura da cevada teve seu início no período colonial, mas o processo de seleção iniciou-se em 1920 por intermédio de imigrantes europeus, principalmente tchecoslovacos que introduziram as primeiras linhagens. A partir de 1976 a área de cultivo se expandiu devido à implantação do Plano Nacional de Auto-suficiência em Cevada e Malte, o qual incluiu a cevada na política dos preços mínimos, crédito e financiamento da produção (MOURA, 1987).

A malteação tem sido no Brasil, a principal aplicação econômica da cevada, já que o país dispõe de outras opções mais vantajosas para a alimentação animal. Nesse sentido, aproximadamente 85% da cevada produzida é utilizada na industrialização de malte, 7% é reservada para semente e 8% na elaboração de rações, quando não atingem padrão de qualidade cervejeira. O consumo anual de malte pela indústria cervejeira brasileira está estimado em um milhão de toneladas, sendo que 70% desta demanda é suprida pela importação de malte Argentino, Uruguaio, Canadense ou Europeu. Seu cultivo está concentrado nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os quais apresentam áreas com características ecológicas semelhantes (TONON, 1992). O Brasil é o quinto mercado mundial na produção de cerveja chegando a 8,47 bilhões de litros, perdendo apenas para China com 27 bilhões, Estados Unidos com 24 bilhões, Alemanha 11 bilhões e Rússia com 9 bilhões de litros (MESQUITA, 2005).

No estado de Goiás iniciou-se em 2004 a plantação em sistema irrigado sendo que a safra ficou em torno de 4.700 quilos por hectare nos cultivares BRS 180 e BRS 195. A preferência dos produtores, tanto no sequeiro como no irrigado, foi pela cultivar BRS 195 por características superiores como ampla adaptação, resistência ao acamamento, doenças, e alta produtividade. Esta cultivar respondeu por 60% da área plantada no Brasil.

As lavouras de sequeiro foram plantadas no Rio Grande do Sul (88 mil hectares) e no Paraná (57 mil hectares) e as cultivares mais plantadas foram BRS 195, MN 698, Embrapa 127, Embrapa 128 e BRS 225 (MINELLA, 2004).

No ano de 2004, a produção agrícola nacional dedicada a cerveja foi de 137mil hectares para produção de 400 mil ton/ano (MESQUITA, 2005), sendo que o planejamento de cultivares feito pelos produtores foi de que a BRS 195 seja plantada em cerca de 93% da área (WOBETO, 2005).

2.2 Bipolaris sorokiniana

O fungo *Bipolaris sorokiniana* era originalmente denominado *Helminthosporium sativum*, sendo descrito pela primeira vez por Link, em 1809, e foi confirmado por S. F. Gray, em 1821 (SHOEMAKER, 1959). A observação da distinção na formação dos conídios das espécies que parasitavam gramíneas (HUGHES, 1953), levou à exclusão destas do gênero *Helminthosporium*.

Com base na germinação dos conídios, (SHOEMAKER,1959) propôs a separação dos fungos graminícolas em três gêneros: *Helminthosporium*, *Drechslera* e *Bipolaris*, e este último apresentava germinação bipolar e conídios fusóides. Uma revisão destes critérios taxonômicos foi feita por Muchovej, et al. (1988). O gênero *Bipolaris* caracteriza-se por conídios curtos, fusiformes e elipsoidais, escuros, arredondados no ápice, com cerca de 75 µm de comprimento, septos sem listras pretas e conidióforos usualmente sem ramificações. Segundo Picinini (1990) *B. sorokiniana* constitui a fase perfeita de *Cochliobolus sativus*, causando uma das mais sérias doenças da cultura de cevada. Turquetti et al. (2001) descreveram que praticamente todas as cultivares brasileiras são sensíveis ao patógeno *B. sorokiniana*. O patógeno sobrevive de uma safra a outra, nas sementes e nos restos de cultura de cevada entre outras (NILSEN et al., 1979).

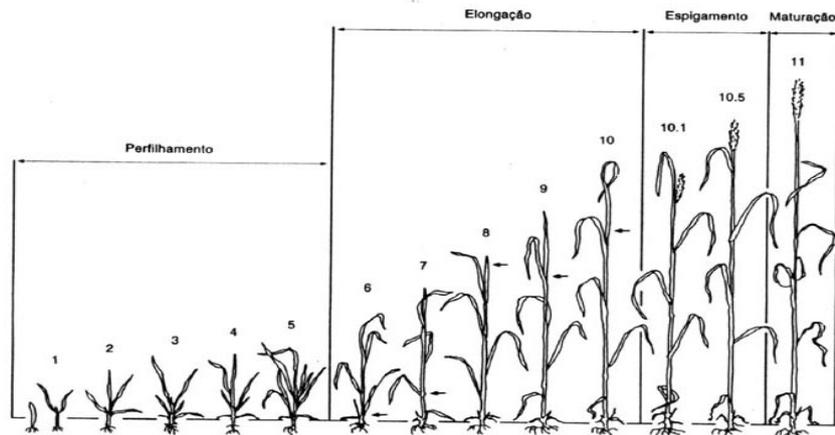
Os fungos, antes de penetrar e colonizar os tecidos vegetais, necessitam aderir a superfície da folha. Essa adesão ocorre por substâncias mucilaginosas produzidas pelo propágulo, contendo misturas de polissacarídeos, glicoproteínas, polímeros de hexosaminas e material fibrilar que, quando úmido, adere o esporo na folha permitindo depois a germinação e conseqüente penetração. Os fungos penetram diretamente pela epiderme através da hifa ou um apressório formado no ponto de contato com a superfície, liberando enzimas para a completa infecção. A penetração pode ocorrer também através de estômatos ou ferimentos da folha. O conídio de *Bipolaris sorokiniana* penetra na folha diretamente ou através dos estômatos e se desenvolve, ocorrendo a patogênese (AGRIOS1997). Como o fungo *B. sorokiniana* 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, além da produção de fenóis nas folhas infectadas (HAMMOND-KOSACK & JONES. 1996).

As folhas apresentam manchas que variam conforme as espécies infectantes. A mancha marrom é causada por *B. sorokiniana*. 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 e observado o efeito de induzir a necrose em folha parecida à de uma lesão pelos patógenos. Desses metabólitos foram identificadas proteínas de baixa massa molecular responsáveis pela produção da lesão, podendo estar também presente em cevada (BACH & KIMATI, 1999).

Sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.), freqüentemente, encontram-se infectadas por fungos patogênicos, como já citado anteriormente, *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoem., *Drecheslera teres* (Sacc.) Shoem. e *Fusarium graminearum* Schwabe, os grandes causadores de doenças que limitam a produtividade dessa cultura no sul do Brasil, especialmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (REIS, 1987), onde as condições climáticas da região do Brasil são muito favoráveis ao desenvolvimento deste tipo de doença. Outro fator a ser considerado quanto à doença causada por *B. sorokiniana* é a efetividade dos tratamentos químicos e biológicos, que são considerados como ferramenta importante para a estabilização da produtividade (MOURA,1987; PICININI & FERNANDES, 2001).

Em 1999 Picinini & Fernandes (2001), concluíram que as condições climáticas ocorrentes na safra de inverno não favoreceram ao aparecimento do fungo *Bipolaris sorokiniana*. Não tendo a mesma sorte no ano seguinte, em que manchas foliares causadas por este fungo, foram as doenças prevalecentes. Em 2003, Carmo et al., trabalharam com distintas cultivares de cevada e relataram que estas reagiram diferentemente em relação a

patogenicidade perante os diferentes isolados de *Bipolaris sorokiniana*. No mesmo ano de 2003, Bach et al., demonstraram que isolados do mesmo fungo em trigo, foram capazes de causar manchas foliares em diferentes cultivares de cevada, sendo estes também capazes de causar doenças em plantas de cevada e trigo. Os autores demonstraram na patogenicidade uma especialização intra e interespecífica associada com estudos eletroforéticos dos isolados.



Legenda da Escala Feekes-Large (LARGE, 1954)

Estágios	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 – a planta atinge o estágio máximo de crescimento.

Figura 1: Escala de Feekes-Large (LARGE, 1954).

Em todas as pesquisas realizadas em casa-de-vegetação com plantas de cereais tais como cevada ou trigo, tem sido trabalhado no estágio 5 da escala de Feekes modificado por Large(1954) (Figura 1). O referido estágio indica que as plantas estão na fase do final de perfilhamento para início de elongação, fases estas suscetíveis ao patógeno.

2.3 Indução de Resistência

Toda e qualquer planta se defende do ataque de um microrganismo invasor, seja fungo, bactéria ou vírus. Cada espécie vegetal tenta impedir o estabelecimento e o desenvolvimento

da maioria dos organismos invasores, podendo assim mesmo ser infectada por alguns deles. Assim, surge o conceito de resistência, como regra e suscetibilidade, como exceção (BACH, 1997).

De acordo com Pascholati & Leite (1994), a resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta de atrasar ou de evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos, sendo caracterizada por sua natureza dinâmica e coordenada, além de mostrar-se como um sistema multicompetente. Este sistema de defesa culmina em um número de alterações fisiológicas e bioquímicas, que buscam limitar a penetração e o desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro.

As plantas podem se defender dos agentes fitopatogênicos passiva ou ativamente. Desta forma, a defesa passiva ou constitutiva depende de fatores existentes nas plantas, denominados pré-formados, passivos ou constitutivos. A resistência induzida é a resistência que depende de fatores presentes somente após o hospedeiro ter sido tratado com agentes bióticos, químicos ou físicos, denominados pós-formados, ativos ou induzíveis. (KUC, 1982; SEQUEIRA, 1983; PASCHOLATI & LEITE (1994).

RAY (1901) foi quem relatou pela primeira vez a indução de resistência, utilizando o termo “vacinação de plantas”, com formas atenuadas de ferrugem. Já, em 1909, Bernad utilizou isolado de *Rhizoctonia repentis* com baixa patogenicidade, para desenvolver resistência ao mesmo fungo virulento em orquídeas.

Em 1911, Smith 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-se de uma suspensão das mesmas bactérias mortas, conseguiu proteger as plantas contra infecções posteriores.

Chester (1933) levantou a hipótese de que as plantas teriam um sistema imunológico similar ao dos mamíferos, isto é, existia a produção de um sinal liberado na folha infectada e translocada para outras partes da planta onde era induzida a reação de defesa.

Esta forma de indução foi denominada primeiramente por Ross (1961) como Resistência Adquirida Sistêmica (SAR) ao ver que folhas superiores de fumo apresentavam lesões necróticas após inoculação com vírus do mosaico do fumo (TMV) nas folhas inferiores. Isto demonstrou que o fenômeno descrito como indução de resistência sistêmica era diferente da resistência induzida após a inoculação com o patógeno foliar.

Diante disto, a indução de resistência passou a ser conhecida como local e sistêmica. Este fenômeno indicou que as plantas ativam um conjunto de respostas após o

reconhecimento de um patógeno ou da aplicação exógena de indutor, capacitando-as assim a responderem mais rapidamente à infecção promovendo uma resposta de resistência. Isto tem sido observado em várias plantas em resposta ao tratamento prévio do hospedeiro com agentes bióticos ou abióticos, denominados elicitores ou indutores de resistência (BENHAMOU & THÉRIAULT, 1992; BENHAMOU et al., 1994; KUC, 1987; 2000; 2001; LYON et al., 1995; MANANDHAR et al., 1999; MORAES, 1991;).

A resistência pode ser induzida mediante diferentes métodos, tais como: pré-inoculação das plantas com raças avirulentas dos patógenos (DEVERALL et al., 1968; ELLISTON et al., 1971, 1976a,b,c, 1977; KUC et al., 1975); inoculação com não-patogênicos (DOLAN et al., 1986); inoculação com patógeno termoinativado ou sonicado com ultra-som (HEALE & SHARMAN, 1977); pré-tratamento das plantas com metabólitos ou filtrados de fungos ou bactérias fitopatogênicos ou substâncias (BACH, 1997; EBRAHIMNESBAT & SCHONBECK, 1985; GUZZO et al., 1993; KESSMANN et al., 1994; MORAES, 1991); e, agentes abióticos como luz ultravioleta, ferimentos, enxertos, entre outros (KUC, 1982). Os elicitores quimicamente são: oligopeptídeos, carboidratos, carboidratos complexos ou ergosterol (OKU, 1994). BOLLER (1995), isolou glicopeptídeos de fungos, capazes de induzir respostas de defesa em diferentes plantas; transformando uma relação compatível numa relação incompatível (SCHAFFRATH et al., 1995). Ebel (1995), mostrou resultados obtidos com os elicitores que indicaram a indução de resistência como um potencial alternativo no manejo de doenças de plantas.

Tanto localmente ou sistemicamente, a resistência induzida, mostra-se dependente do tempo entre aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno; dependente da temperatura, da concentração do indutor versus patógeno (KUC, 1987; SEQUEIRA, 1979; 1983).

A indução de resistência esta relacionada ao tempo, como descrito por Pascholati et al. (1986) que observaram o fenômeno de resistência em plantas de melão, quando tratadas com o indutor 24 horas antes da inoculação com o patógeno *Mycosphaerella melonis*. Bach (1997) trabalhando com trigo, *Bipolaris sorokiniana* e com indutor goma xantana, observou que o tempo de intervalo de 48 e 72 horas entre indutor e patógeno foi suficiente para a indução. Rodrigues et al. (2002) observaram o mesmo tempo para indução de resistência em plantas de cevada tratadas com alicina contra *Bipolaris sorokiniana*.

A indução também pode estar relacionada à concentração do indutor provocador, em que vários autores demonstraram que a resistência é dependente da concentração. Pascholati et al. (1986) constataram que quanto maior a concentração de *M. melonis* (provocador), menor foi a proteção em plantas de melão pré-inoculadas com *Helminthosporium carbonum*.

Guzzo et al. (1993) verificaram que o aumento na concentração da goma xantana ou de glicose dos EPS (exopolissacarídeo), aumentava até certo nível a porcentagem de proteção em plantas de café contra *Hemileia vastatrix*. Bach (1997) e Bach et al. (2003b), observaram a indução de resistência em plantas de trigo quando inoculadas com goma xantana na concentração de 0,5 mg/mL e no intervalo de 48 horas. A resistência foi observada para *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana*, e *Drechslera tritici-repentis*.

A resistência induzida nas plantas não se mostra específica, sendo efetiva contra vários tipos de patógenos e em diferentes interações como: trigo - *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera teres* (BACH, 1997); cevada - *Bipolaris sorokiniana* (CASTRO et al, 2001; 2002; CASTRO & BACH, 2004; RODRIGUES et al., 2002; SILVA, 2005; FELIPE, 2005); café - *Hemileia vastatrix* (GUZZO et al., 1993); arroz - *Pyricularia oryzae* e *Bipolaris sorokiniana* (MANANDHAR et al, 1999) e pimentão - *Phytophthora capsici* (HWANG et al., 1997).

Como elicitores isto é, substâncias que induzem reações de defesa nas plantas, existem várias estruturas analisadas as quais são: ácido aracdônico, ácido jasmônico e ácido salicílico, entre outros (BOLCH et al., 1984; CREELMAN et al., 1992; RASKIN, 1992).

O potencial para uso de indutores de resistência no controle de doenças não chamou a atenção apenas da comunidade de pesquisa, mas também da área comercial. Atualmente, existem alguns indutores de resistência no mercado mundial: o Oryzemate® , o Bion®, o Messenger®, o Oxycom™ , o Elexa® e o Opera®.

O Oryzemate® (probenazole) é um produto para proteção do arroz contra a brusone que já conta com mais de 20 anos de mercado no Japão e sem que haja um único relato de surgimento de resistência em populações de *Pyricularia grisea*. O produto não apresenta ação fungicida sobre o patógeno tanto quanto não reduz a virulência do mesmo. A ativação da defesa é feita por enzimas na via dos fenilpropanóides, tais como a fenilalanina amônia liase, peroxidase e polifenoloxidase (IWATA et al., 1980).

A via dos fenilpropanóides tem sido importante no sistema de defesa da planta, pois quando a planta é infectada a lignina é sintetizada e atua como uma barreira física contra a invasão do patógeno e é produzida a fitoalexina com atividade antimicrobiana. Isto veio contribuir como limitação da invasão do patógeno no tecido da planta. Além disto foi observado a presença do gene em plantas de arroz correspondendo a PR (proteínas relacionadas a resistência) (IWATA, 2001). Além do arroz esse produto é usado em algumas culturas hortícolas, mostrando-se efetivo, não só para o controle de fungos e bactérias, mas também para o controle de viroses (KOGANEZAWA et al., 1998).

O Bion® (acibenzolar S-metil, ASM) foi lançado em 1996 na Alemanha. Hoje, já tem registro em diversos países, inclusive no Brasil. A comercialização do Bion® é feita em formulações em que o ASM é o único produto ativo ou ainda em formulações onde há um fungicida conjugado. No caso de formulações em que o ASM é o único princípio ativo, o produto é recomendado em parceria com fungicidas. Isso provavelmente se deve ao fato de que o uso de um indutor de resistência, junto com um fungicida, apresenta efeitos sinérgicos no controle das doenças-alvo (HAMMERSCHMIDT, 1999a; MOLINA et al., 1998). O ASM é um análogo do ácido salicílico (AS) e age na cascata de sinais, um dos eventos que leva à SAR (“Resistência Adquirida Sistêmica”) (HAMMERSCHMIDT et al., 2001; METRAUX, 2001; OOSTENDORP et al.; 2001).

O ingrediente ativo do Messenger® é uma proteína, produzida por um gene *hrp*, da bactéria fitopatogênica *Erwinia amylovora*. O Elexa®, além de ingredientes inertes, contém um carboidrato, a quitosana, extraído do exoesqueleto de crustáceos. Tanto a proteína *hrp* do Messenger® como a quitosana do Elexa® agem ligando-se a receptores existentes na membrana celular de plantas, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre em uma interação incompatível entre planta e patógeno (EPA, 2000).

O Oxycom™ é formado pela combinação de dois compostos, o primeiro é uma mistura de nutrientes e o segundo uma mistura de ácido peracético, ácido acético e H₂O₂. O produto é capaz de aumentar a atividade de enzimas importantes ligadas a SAR, como a fenilalanina amônia-liase (PAL), chalcona sintase e peroxidases (PO) e proteger plantas contra nematóides e fungos (KIM et al., 2001).

O Opera® é um novo fungicida pertencente a família F500 promovido pela Basf. F500 reúne uma grande família de fungicidas recomendados para as mais diversas e importantes culturas com moderno ingrediente ativo Pyraclostrobin (C₁₉H₁₈ClN₃O₄ (carbami-cacid, [2-[[[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy]methyl]phenyl] methoxy-, methyl ester).

O fungicida Ópera pertence à classe dos estrubilurinas (ÓPERA, 2005; F500, 2005). “Strobilurins” ou estrubilurinas são produtos produzidos por fungos, no caso foi encontrado em cogumelos, isto foi descoberto por um grupo de cientistas alemães no ano de 1970 encontrado originalmente em simbiose no pinus como *Strobilurus tenacellus*. Este fungo produzia a estrubilurina e protegia os pinus de diferentes doenças. Entretanto a molécula era instável na presença de luz. Assim, isto foi melhorado na indústria em meio sintético passando assim a ser fungicida da Classe II (ÓPERA, 2005).

Inicialmente o Opera® foi usado para o controle das principais doenças da cultura da soja, tendo ação sistêmica, e foi associado a Epoxiconazole que apresenta efeito sistêmico, permitindo que a soja tenha maior produtividade e rentabilidade (ÓPERA, 2005).

O Opera® é uma alternativa disponível no mercado internacional e nacional para o controle de doenças foliares da soja. Para o seu lançamento, foram necessários aproximadamente 10 anos de estudos. Atualmente está sendo utilizada em outras culturas. No caso de cevada ainda está em testes (ÓPERA, 2005).

2.3.1 Respostas de Defesa

Para que haja uma resposta de defesa por parte da planta é necessário, primeiramente, que a planta reconheça o patógeno. Este reconhecimento normalmente se dá por meio da ligação de um elicitador a um receptor presente na membrana plasmática. A partir desta ligação ocorre a sinalização e a síntese de compostos de defesa.

Normalmente as respostas de defesas são divididas em barreiras estruturais e em barreiras químicas e podem ser resultado da ativação de genes de defesa ou do aumento da atividade de determinadas enzimas (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A primeira barreira que um fungo encontra na planta é a cutícula. As cutinases produzidas por patógenos degradam a cutina, facilitando a penetração. A cutina presente na cutícula tem composição bastante complexa e, aparentemente, a indução de resistência é capaz de alterar sua composição, tornando-a mais resistente à degradação enzimática. Vencendo a cutícula, o fungo encontra a parede celular vegetal, que, assim como a cutícula, pode ser penetrada tanto por ação mecânica como por ação enzimática (HUANG & KUC, 1995).

Em estudos com pepinos a fortificação da parede celular vegetal, obtida por tratamento com indutores de resistência, é responsável pelo fracasso de um grande número de tentativas de penetração de fungos. Em hipocótilos de pepino tratados com o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (DCIA), a redução na penetração chega a ser de quase 100 % em relação a hipocótilos não tratados (FAUTH et al, 1996).

Estudos citológicos e histológicos demonstram que as alterações ocorridas em plantas com resistência induzida podem variar. Stein et al. (1993) verificaram que a indução de resistência em pepinos através de inoculação controlada com *Colletotrichum lagenarium* não

causa alterações citológicas qualitativas, mas sim, quantitativas. O uso de Milsana[®], também em pepino, provoca alterações qualitativas como formação de papilas, aposições de parede e acúmulo de compostos fenólicos, assim como modificações de estruturas do patógeno não observadas em patógenos presentes em tecidos não tratados com o indutor (WURMS et al., 1999). A mesma gama de respostas foi verificada em plantas de tomate tratadas com glucanas, quitina e laminarina e em plantas de ervilha, tratadas com um fungo endofítico. O interessante nestes casos é que o patógeno, ou o fungo endofítico, penetram na planta tratada. No entanto, o desenvolvimento do fungo fica restrito às células da epiderme e suas estruturas sofrem alterações drásticas, inviabilizando a infecção (BENHAMOU & GARAND, 2001; BENHAMOU & LAFONTAINE, 1995).

Fungos inoculados em plantas tratadas com ativadores de resistência apresentam germinação normal dos esporos com a emissão do tubo germinativo, formação de apressório e da hifa de penetração. No entanto, a penetração não ocorre normalmente. Muitas hifas de penetração são aprisionadas por papilas ou têm seu desenvolvimento retardado por aposições de parede, em ambos os casos impregnados por compostos fenólicos. Outro fator estrutural que contribui para o insucesso da infecção é a fortificação da parede celular por meio de ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina ou pelo aumento da lignificação (AGRIOS, 1997; WURMS et al., 1999). Além das barreiras estruturais, diversas barreiras químicas também são formadas quando ocorre a indução de resistência. A indução de resistência leva à ativação de uma série de genes, conhecidos como SAR-genes. Esses genes codificam proteínas que têm atividades diversas e agem, em conjunto, para restringir a invasão do patógeno. Entre essas proteínas estão as (PRPs-Proteínas Relacionadas com Patogênese) e enzimas do metabolismo secundário vegetal. As PRPs são um grupo de enzimas sintetizadas em resposta à infecção ou a outras situações de estresse. Atualmente, essas proteínas estão agrupadas em 14 famílias, sendo que algumas têm atividade conhecida e outras não (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999).

Entre as PRPs mais pesquisadas estão as quitinases e as β -1,3 glucanases. Essas duas enzimas têm atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos (ANDREU et al., 1998; LORITO et al., 1993; WALTON, 1997). A modificação genética de plantas para expressão constitutiva dessas proteínas faz com que a resistência contra infecções seja aumentada (COVENTRY & DUBERY, 2001; EVANS & GREENLAND, 1998; HONÉE, 1999; LORITO et al., 1998). Além disso, a atividade dessas enzimas é aumentada quando plantas são tratadas com elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência (KÄSTNER et al., 1998; GÖRLACH et al., 1996; JACOBS et al.,

1999; SLOVÁKOVÁ et al., 2000; SCHWEIZER et al., 2000). O incremento na atividade dessas enzimas e a restrição de patógenos, tanto em plantas modificadas geneticamente como em plantas tratadas com elicitores, leva a crer que as PRPs desempenham papel importante na contenção de infecções.

As respostas de defesa comentadas acima são apenas alguns dos mecanismos de proteção utilizados pelas plantas, sendo difícil avaliar o quanto cada uma contribui para o estado de resistência induzido. Uma das primeiras respostas de defesa manifestadas em relações incompatíveis é a explosão oxidativa que desempenha papel importante no estabelecimento da reação de hipersensibilidade (HR). A HR por sua vez é frequentemente associada com a resistência induzida, sendo que, sem HR, não há resistência sistêmica induzida (COSTET et al., 1999).

Entre as reações bioquímicas de defesa frequentemente verificada em plantas tratadas com elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência temos: ocorrência de explosão oxidativa (SVALHEIM & ROBERTSEN, 1993), aumento na atividade da peroxidases e de enzimas hidrolíticas (DALISAY & KUC, 1995a, 1995b; MORAN & CIPOLLINI, 1999; SLOVÁKOVÁ et al., 2000) e acúmulo de fitoalexinas fenólicas (DAAYF ET AL., 1995, DAAYF ET AL. 1997; FAWE et al., 1998). O aumento da lignificação (STEIN et al., 1993), a explosão oxidativa, a HR, as peroxidases e os fenóis (incluindo fitoalexinas) estão bastante relacionados com a resistência induzida.

2.3.2 Compostos com Possíveis Funções de Sinais

Um dos compostos que vêm sendo considerados como sinais bioquímicos de indução é o etileno. Plantas o sintetizam tanto como resposta a ferimentos como à infecção por patógenos e à exposição a eliciadores de mecanismos de defesa (BOLLER, 1990; GROSSKOPF *et al.*, 1991). Mauch *et al.* (1984) encontraram que indução de síntese de quitinase e de β -1,3-glucanase, proteínas associadas a resistência dinâmica, ocorre em vagens de feijoeiro expostas a aminoetoxivinilglicina (inibidor da síntese de etileno), o que levou Sticher et al. (1997) a interpretar que esses resultados podem significar que a síntese de etileno ocorrendo concomitante com a indução de resistência poderia ser mais um efeito que uma causa.

Ácido jasmínico (JA), jasminatos e seus derivados encontram-se largamente distribuídos em tecidos de plantas (STUMPF & CONN, 1981). STICHER et al. (1997) consideram ainda um pouco controversas as evidências experimentais de que JA e seus derivados podem se constituir em sinais bioquímicos de resistência sistêmica induzida. Entretanto, a frequência com que eles ocorrem em tecidos vegetais, aliada à sua conhecida mobilidade nos tecidos e entre plantas (análogos voláteis) podem apontar na direção de uma função sinalizadora, no entender de Farmer & Ryan (1990). Também Sticher et al. (1997), mesmo colocando em dúvida a real função de JA e de seus análogos, como sinais, lembram que devem ter algum envolvimento com a resistência sistêmica adquirida já que sua aplicação em plantas induz a síntese de eventos tipicamente associados à fenomenologia, como síntese de osmotina, de sintetase chalcônica, de fenilalanina amônia-liase (PAL) e de lacase oxidase (LOX). Em resumo, se sua participação em SAR (“Systemic Acquired Resistance”) e ISR (“Induced Systemic Resistance”) parece evidente, seu papel como sinal ainda não é muito claro.

Podem ser incluídos na categoria de prováveis sinais bioquímicos de resistência sistêmica induzida o ácido salicílico (SA), salicilatos e seus análogos. White (1979) observou que a exposição de plantas de fumo a SA induzia a síntese de proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) e concomitante resistência sistêmica a TMV. Van Loon em 1983, também constatou que a exposição de plantas de fumo a etileno tinha o mesmo efeito e hipotetizou que esse acúmulo deve-se a algum composto com atividade semelhante à do ácido salicílico (AS). Algum tempo depois, Malamy *et al.* (1990), também trabalhando com fumo, levantaram a hipótese de que SA poderia ser um sinal endógeno já que salicilatos se acumulam tanto local como sistemicamente como resposta de plantas de fumo à inoculação com TMV.

2.3.3 ISR & SAR e Suas Rotas Metabólicas

Duas siglas em inglês – ISR (“Induced Systemic Resistance”) e SAR (“Systemic Acquired Resistance”) têm sido usadas como sinônimos embora não o sejam. Ambas designam o fenômeno através do qual plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (STICHER et al., 1997).

Em verdade, autoridades contemporâneas (KLOEPPER, 1999; MÉTRAUX, 1999; PIETERSE et al., 1998; VAN LOON, 1999; VAN LOON et al., 1998) parecem concordar que SAR e ISR são fenômenos distintos quanto à forma através da qual são induzidos. Mas bastante semelhantes, se não idênticos, no que concerne ao resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência com caráter de sistemicidade.

Pesquisas anteriores de mecanismos moleculares envolvidos na SAR induzida por patógeno, demonstram que o início da SAR é acompanhado por aumento local e sistêmico de níveis endógenos de ácido salicílico (MALAMY et al., 1990; MÉTRAUX et al., 1990) e concomitantemente, um aumento de expressão de um grupo enorme de genes (WARD et al., 1991), incluindo aqueles que traduzem para proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Várias proteínas PRPs possuem atividade antimicrobiana e acredita-se contribuírem para a planta atingir o estado de SAR. Contrariamente, plantas transgênicas contendo o gene bacteriano NahG, que expressam a enzima salicilato-hidroxilase, foram incapazes de acumular ácido salicílico e são afetadas na SAR (GAFFNEY et al., 1993), demonstrando que o ácido salicílico (AS) é necessário e suficiente para induzir SAR (RYALS et al., 1996). Escrutínios feitos em populações de mutantes de *Arabidopsis*, revelaram uma série de plantas mutantes que aparentam ter o mesmo gene afetado (CAO et al., 1994; DELANEY et al., 1995). Esse gene foi denominado *npr1* (não expressor de PR genes) ou *nim1* (não imune). Plantas mutantes *npr1* acumularam níveis normais de ácido salicílico depois da infecção, mas diminuíram as suas habilidades de expressar genes PR e de responder a SAR, indicando que NPR1 age abaixo do AS na rota metabólica de SAR. O gene NPR1 codifica proteínas com repetições do tipo ankyrinas, as quais são conhecidas por mediar interações protéicas e estão presentes em proteínas com as mais diversas funções (CAO et al., 1997; RYALS et al., 1997). Existe evidência que sob indução de SAR, NPR1 é translocada para o núcleo, onde ativa a expressão de genes PR por interação física com uma subclasse de fatores de transcrição contendo zipper de leucina, que se ligam às seqüências promotoras requeridas para a expressão de genes PR induzida por AS (ZHANG et al., 1999; KINKEMA et al., 2000; SUBRAMANIAM et al., 2001). Pesquisas no mecanismo molecular da ISR induzida por rizobactéria foi inicialmente focada no papel das PRPs, como se o acúmulo dessas proteínas estivesse diretamente correlacionado com a resistência induzida. Entretanto, plantas de rabanetes que tiveram suas raízes tratadas com o indutor de ISR, WCS417r, não acumularam proteínas PR, apesar de que essas plantas demonstraram claramente um aumento na resistência contra murcha de *Fusarium* (HOFFLAND et al., 1995). De modo similar, plantas de *Arabidopsis* expressando ISR

mediada por WCS417r, demonstraram um aumento de resistência contra *F. oxysporum* f.sp. *raphani* e Pst DC3000, mas isso não coincidiu com uma ativação dos genes marcadores de SAR, PR-1, PR-2 e PR-5 (PIETERSE et al., 1996; VAN WEES et al., 1997). A determinação de níveis de AS em plantas de *Arabidopsis* expressando ISR, revelou que ISR não é associada com acúmulo de AS (PIETERSE et al., 2000). Além disso, ISR mediada por WCS417r, expressou-se normalmente em plantas de *Arabidopsis* não acumuladoras de AS, plantas NahG (PIETERSE et al., 1996; VAN WEES et al., 1997). Com isso, conclui-se que ISR mediada por WCS417r é independente da resposta da resistência por ácido salicílico (AS), e que a ISR induzida por rizobactéria e SAR induzida por patógeno são reguladas por rotas metabólicas distintas, no caso de ISR a sinalização está mais associada a jasminatos e etileno (PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al., 1998)

Dessa maneira, através dos vários trabalhos, pode-se observar que embora a resistência induzida seja um fenômeno não permanente e não hereditário, é de extrema importância para proteger a planta nos períodos críticos mais favoráveis à ocorrência da doença. É necessário ainda considerar que o efeito sistêmico da indução de resistência não é específico, podendo ser efetivo contra fungos, bactérias, vírus ou viróides (BACH, 1997). Para a comprovação do efeito se faz necessário analisar as macromoléculas bioquímicas ligadas à indução de resistência.

2.4 Os Cogumelos

O documento mais antigo sobre os cogumelos como agente medicinal vem da Índia, 3000 anos antes de Cristo. Na China os efeitos benéficos de várias espécies de cogumelos foram compilados no "Shen Nong Ben Cao Jing" uma espécie de matéria médica escrita entre 200 AC e 200 DC. Foi na França que o cultivo do cogumelo teve início no reinado de Luiz XIV (1638-1715). Os cogumelos são fungos ainda pouco conhecidos pela sociedade brasileira, porém sabe-se que índios utilizavam algumas espécies na alimentação e também no combate a hemorragias, cólicas, feridas e outras doenças. Eles denominavam os fungos de urupê, em tupi-guarani que significa cogumelos e urupê-tinga, urupê-piranga como fungos distintos o que mostra uma noção de taxonomia. Esses conhecimentos como muitos outros dos indígenas, foram praticamente perdidos e não fazem parte da cultura brasileira atual. Entretanto somente em 1707 a técnica que ainda nos dias atuais vem sendo observada no Brasil, foi então desenvolvida pelos cultivados Freucmnaw Tourmefort (FERREIRA, 1998).

O cultivo tornou-se crescente em todo mundo podendo ser feito em pequenas áreas, se comparados com a ocupada por outros produtos e com baixo custo. Trata-se de um fungo, ou seja, um organismo saprófito, portanto, transformam resíduos orgânicos e florestais em proteínas (FERREIRA, 1998).

Existem pelo menos 10.000 espécies de cogumelos, 700, comestíveis, 50 a 200 com propriedades medicinais e 50 espécies venenosas. Seis gêneros de cogumelos são responsáveis por 90% da produção mundial de 1,5 milhões de toneladas / ano: *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Volvariella* e *Flammulina*.

2.4.1 O Cogumelo *Agaricus sylvaticus*

O cogumelo *Agaricus sylvaticus* (Figura 2A) é um cogumelo tipicamente brasileiro. Foi descoberto no município paulista de Tapiraí em 1965 pelo imigrante japonês T. Furumoto, (BACH, 2005). Em 1972, Sr. Furumoto enviou amostras do fungo ao Japão para serem analisadas, tendo sido classificado como *Agaricus sylvaticus* pelo Instituto Real de Botânica, na Inglaterra.

O cogumelo *Agaricus sylvaticus* pertence à Divisão Basidiomycota e a ordem dos Agaricales. Esta ordem tem sido bastante estudada, compreende 300 gêneros e aproximadamente 5.000 espécies em termos mundiais (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). No Brasil são conhecidos 136 gêneros e 1011 espécies, de acordo com levantamento da produção científica referente aos anos de 1900-1991 (PUTZKE 1994). Entretanto, estes números vêm sendo alterados a cada dia com as descrições de novas espécies (CANTRELL & LODGE, 2001).

A classificação e descrição das espécies desta ordem baseiam-se, fundamentalmente, nos caracteres morfológicos, anatômicos e bioquímicos dos basidiomas (SINGER, 1972; PEREIRA, 1984).

O *Agaricus sylvaticus* (Schaeffer), cresce sob a presença de luz, o que lhe valeu o registro de Cogumelo do Sol[®], nasce em temperaturas elevadas de 25-28°C, devendo a noite apresentar temperaturas baixas tendo a capacidade de absorver e reter do sol, ar, e da terra, energia e substâncias que nenhum outro tipo de cogumelo é capaz de fazer. A região que está sendo plantada é a de Tapiraí (SP) e Mogi das Cruzes (SP), (BACH, 2004).

A produção e as exportações no Brasil, que é o maior produtor mundial desta espécie, aumentaram nos últimos anos, passando a sua produção/exportação em 1996 de 7.440 Kg para 32.602 Kg em 2001, porém houve um decréscimo para 20.072 Kg em 2003 (CACE, 2001, 2004). O interesse na espécie é devido às propriedades anti-mutagênicas, anti-tumorais, anti-virais, anti-trombótica, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica e anti-oxidante, atividades essas relacionadas a uma ampla gama de substâncias, como ésteres, ácido linoleico e oleico, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (BACH, 2005; BRUM, 2005; CHEN et al., 2004; DELMANTO et al., 2001; EGUCHI et al., 1999; GUTERREZ et al., 2004; HUANG et al., 2004; LUIZ et al., 2003; MATSUI et al., 2003; STAMETS, 1997). Dentre essas substâncias ativas, os polissacarídeos, como as beta-glucanas, os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas, são os principais responsáveis pela atividade anti-tumoral.

Diversos países que utilizam os cogumelos, são principalmente como nutracêutico, termo esse usado para uma nova classe de subprodutos que são obtidos de frutificações (cogumelos) ou do micélio, minimamente processados, e encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos com propósito terapêutico. As frutificações produzidas pelo fungo podem também ser consumidos *in natura*, constituindo um alimento muito apreciado em diversos países, pelo seu sabor, tornando-se assim um alimento funcional ou nutracêutico (CHANG; BUSWELL, 1996). Na preparação dos nutracêuticos são utilizadas frutificações em diferentes estágios de maturação, fato que pode influenciar na qualidade desses subprodutos. Podendo ainda ser encontrado no mercado sob a forma de cogumelo seco e fragmentado devendo ser consumido na forma de infusão (chá) quente ou frio.

No presente trabalho foi utilizado extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* como indutor para depois, na continuação do projeto, purificar parcialmente o extrato a fim de descobrir qual a estrutura específica que possui a função de indutor, podendo assim baratear a aplicação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo do extrato de *Agaricus sylvaticus*

Os cogumelos da região de Tapiraí (Figura 2), são conhecidos como *Agaricus sylvaticus*, cogumelo este utilizado como complemento nutricional e comercializado pela empresa Cogumelo do Sol[®].

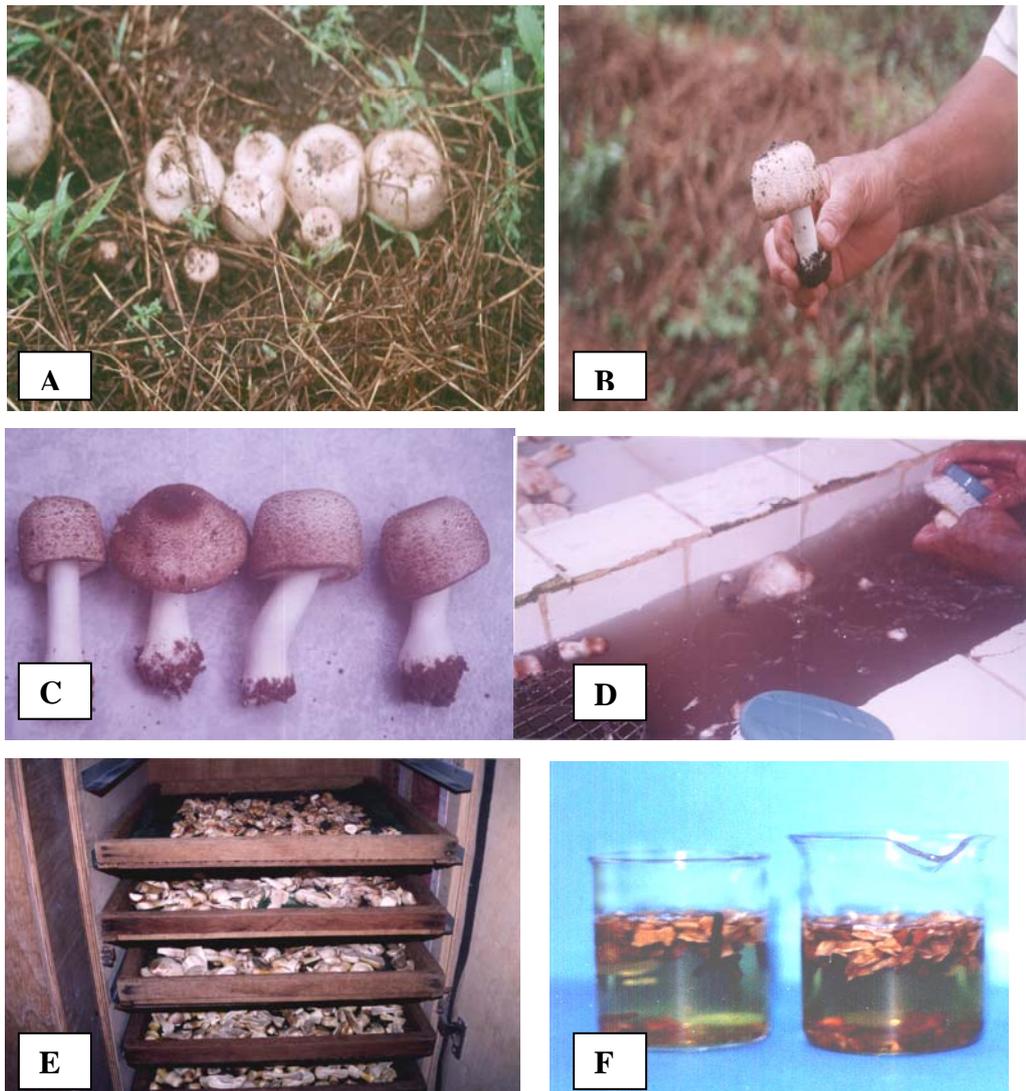


Figura 2: A. Aspecto do cogumelo *Agaricus sylvaticus* desenvolvido no solo em Tapiraí, B. colheita, C. *Agaricus sylvaticus* selecionados, D. lavagem dos cogumelos selecionados, E. secagem (desidratação), F. preparação do extrato de cogumelo *Agaricus sylvaticus* (fotos do autor).

Os cogumelos foram colhidos, lavados e secos (Figura 2) sendo realizada a quantificação de proteínas e fenóis presentes nos mesmos. O extrato foi feito com 1 grama de cogumelo em 20mL de água, fervido por 10 minutos e depois filtrado em gaze (Figura 2F) resultando em um extrato na concentração de 1,2mg de proteína. Esta quantidade tem sido utilizada como complemento nutricional em ser humano e assim, foi utilizada esta concentração e mais duas sendo uma 2,4mg de proteína e outra 0,6mg de proteína. O extrato foi submetido a quantificação de proteínas (método de Lowry, em equivalentes de SAB/ml Soro Albumina Bovina) (LOWRY, 1951) e, quantificação de fenóis baseado no método de Swain & Hillis (1959).

3.2 Preparação do Isolado.

O isolado de *Bipolaris sorokiniana* foi obtido a partir de folhas de cevada oriundas do campo da Fundação de Guarapuava no Paraná, cultivar Embrapa 128, mantido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).

A suspensão de esporo foi preparada colocando 10mL de água destilada estéril com 0,05% de Tween 20 (poli-oxietilen sorbitan monolauret, Sigma Chemical Co.) nas placas de petri contendo as culturas e, retirando-se os esporos com alça de Drigalsky. A suspensão foi filtrada em gaze e, contado os esporos em hematocitometro até a concentração de 2×10^5 conídios mL⁻¹.

3.3 Teste Biológico do Extrato:

Um mL do extrato de cogumelo foi transferido em um tubo de ensaio contendo 10mL de BAD (batata-ágar-dextrose) esterilizado e passado 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 a contagem em hematocitômetro. Paralelamente foi inoculado o fungo em placas controles.

3.4 Sementes

As sementes das variedades Embrapa 128 e 195 foram enviadas pela Fundação Agrária de Produtores de Cevada Cervejeira em Guarapuava, Paraná.

3.5 Preparação das Plantas para Ensaio Prévio do Extrato.

Para a preparação das plantas foram semeadas dez sementes da cultivar Embrapa 128 em vasos e, mantidas em casa-de-vegetação à temperatura ambiente até o estágio 5 da escala de Feekes-large (LARGE, 1954). Na composição do substrato foram utilizadas uma parte de solo vermelho, oriundo do Paraná e uma parte de terra vegetal adubada com NPK (na formulação 10-10-10) e micronutrientes marca Ouro Verde (de acordo com a especificação do produtor).

Um total de 140 plantas foi separado em grupos de 10 plantas cada, sendo repetido o experimento por três vezes. Os tratamentos foram: a-sadia (plantas aspergidas com água); b-inoculadas com os patógenos (plantas aspergidas com suspensões dos isolados); c- tratadas com indutor na concentração de 2,4mg de proteína; d- tratadas com indutor (conc. 2,4mg proteína) e após 24 h inoculadas com suspensão de conídios; e- idem ao grupo d, entretanto, após 48 horas; f- idem ao grupo d, entretanto, após 72 horas. Os grupos g,h,i,j foram semelhantes aos grupos c,d,e,f entretanto com extrato na concentração de 1,2mg de proteína. Já os grupos k,l,m,n mesmo sendo similares aos c,d,e,f receberam extratos na concentração de 0,6mg de proteína.

Durante as primeiras 24 horas após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% UR), temperatura ambiente e escuro. Em seguida, o material foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente.

A proteção das plantas foi avaliada 4 dias após a inoculação do patógeno de acordo com BACH (1997).

3.6 Tratamentos Para Indução Local.

Foram preparados lotes das variedades de cevada Embrapa 128 e Embrapa 195. A concentração do extrato utilizada foi a de 1,2mg de proteína. Em todos os tratamentos foram aspergidos cerca de 10mL da suspensão de conídios e ou, solução do extrato (indutor) ou ainda, água.

Foram semeadas sementes das duas variedades e separadas em grupos de 10 plantas cada e com 3 repetições.

Os tratamentos foram: a-sadia (plantas aspergidas com água); b-tratadas com indutor (plantas aspergidas com extrato); c- inoculadas com os patógenos (plantas aspergidas com suspensões dos isolados); d- tratadas com indutor e após 24 h inoculadas com suspensão de conídios; e- idem ao grupo d, entretanto, após 48 horas; f- idem ao grupo d, entretanto, após 72 horas.

As plantas dos grupos d, e, f, foram inicialmente aspergidas com indutor sendo que após 24, 48 e, 72 horas, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente $7,35 \text{ W m}^{-2}$), as folhas foram inoculadas, por aspersão, com as suspensões de conídios do isolado. Durante as primeiras 24 horas após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% UR), temperatura ambiente e escuro. Em seguida, o material foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente.

A proteção das plantas foi avaliada 4 dias após a inoculação do patógeno de acordo com Bach (1997). As folhas dessas plantas foram coletadas, submetidas à extração e, realizadas as quantificações bioquímicas das macromoléculas.

3.7 Tratamento de Indução Sistêmica

Grupos de 10 plantas cada de cevada variedade Embrapa 128, foram submetidas a tratamentos: 1) Sadia = plantas pulverizadas com cerca de 10mL de água; 2) extrato = plantas pulverizadas com 10mL do extrato de cogumelo; 3) Infectada = plantas pulverizadas com 10mL da suspensão de conídios (10^5 conídios/mL); 4) Sist 1T = pinceladas as primeiras

folhas (F1T) com 2mL do extrato; 5) Sist 2 T = pinceladas as segundas folhas (F2T) com 2mL do extrato.

Após 48 horas da aplicação do extrato de cogumelo nos tratamentos 4 e 5, as plantas de cevada foram aspergidas com 10mL da suspensão de conídios (10^5 conídios/mL).

A proteção das plantas foi avaliada 04 dias após a inoculação do patógeno sendo as folhas (primeira e segunda), da mesma planta, coletadas separadamente. Após a coleta foram submetidos à extração e quantificação de proteínas, fenóis e beta-1,3-glucanase.

3.8 Efeito do Fungicida Ópera

Como comparação do indutor de resistência foi utilizado o fungicida Ópera que consta do fungicida mais inovador F500 promovido pela Basf, que é uma molécula proveniente de um produto natural transformado em indústria como fungicida. Dessa forma, o mesmo foi utilizado na pulverização na concentração de 0,6L/ha/100 litros de água.

Assim, grupos de plantas de cevada foram submetidos a diferentes tratamentos:

A + fungo: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o cogumelo, sendo após 48 horas pulverizadas com o fungo.

A + ópera + fungo: grupo de plantas com 14 dias de germinação, submetidas a pulverização com o cogumelo, após 10 dias, pulverizadas com o fungicida ópera, sendo após 72 horas pulverizadas com o fungo.

Infectada: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o fungo.

Ópera + fungo: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o fungicida ópera, sendo após 72 horas pulverizadas com o fungo.

Em relação aos tratamentos, foi verificado o número de folhas de cevada com lesões após uma semana em casa-de-vegetação, e, preparados os extratos das respectivas folhas e a realização de análises bioquímicas.

3.9 Análises Bioquímicas

As folhas de todas as plantas submetidas aos tratamentos foram removidas e estocadas no freezer até à realização do extrato, bem como, almofariz e tampão também gelados.

Para a extração foram utilizados 1g de folhas homogeneizadas em almofariz com 1mL do tampão fosfato pH=7 / 0,1M. O extrato foi mantido em geladeira por um período de 1 hora, filtrado em gaze e guardado no freezer para posterior análise.

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Lowry, em equivalentes de SAB/mL (SORO ALBUMINA BOVINA) (LOWRY, 1951). O total de fenóis foi analisado através do método de Folin-Ciocalteu sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido clorogênico por mL (mg Eq. Ac. clorogênico/mL) (SWAIN & HILLIS, 1959).

A atividade da enzima foi medida pelo aumento dos grupos redutores de açúcares usando como substrato laminarina (Sigma) e o teste de açúcares redutores segundo (LEVER,1972). A glicose foi usada como padrão sendo que uma unidade do grupo redutor foi definida como quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ M de glicose em 1 minuto a 37°C (VAN HOOFF et al., 1991).

3.10 Análise Eletroforética

Foi realizada a eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida, na concentração de 7% de AA (acrilamida) e Bis (N-metil bis acrilamida) em placa horizontal. As amostras apresentavam 300 μ g em equivalentes de SAB/mL, segundo método utilizado por BACH (1997). A coloração realizada para isoenzimas de esterase foi pelo método segundo Stegemann & Burgermeister (1987).

Para a avaliação foram comparadas as bandas de isoenzimas existentes nas plantas sadias, infectadas e submetidas aos diferentes tratamentos, utilizando programa Analista Molecular, da Biorad, acoplado ao computador e ao densitômetro situados no Laboratório de Bacteriologia Animal do Instituto Biológico.

3.11 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e a média analisada pelo método de Student's ou Origin (Anova).

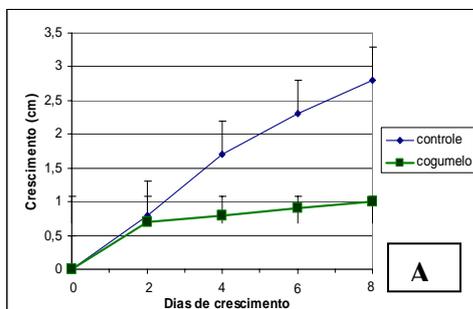
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato de Cogumelo

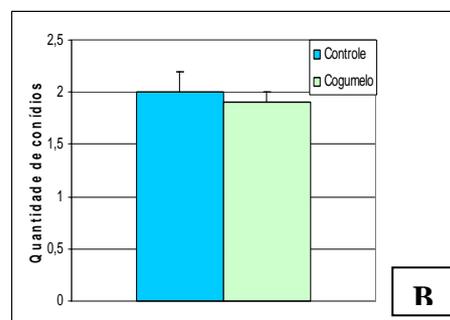
O extrato de cogumelo bruto, originado da extração de 1g de cogumelo seco, apresentou a concentração de 1,2 mg de proteínas e 0,4mg de fenóis.

Desse extrato somente a diluição de 1:10 foi utilizada no teste biológico em placa contendo 0,120mg de proteína e 0,04 mg de fenol.

No teste biológico, incorporando o extrato em meio de cultura de BAD, foram observados o desenvolvimento micelial e a quantificação de conídios. Na Figura 3, pode-se observar que o extrato de cogumelo reduziu o crescimento micelial quando comparado com o controle. Entretanto, ao observar a contagem de conídios $\times 10^6$, a quantidade foi próxima. Isto veio indicar que o extrato reduziu o desenvolvimento micelial não tendo influência na formação de conídios. Isto veio demonstrar que o extrato não possui ação fungitóxica pois o patógeno esporula da mesma forma do que em meio contendo água.



Figura



3A:

Desenvolvimento (cm) do isolado de *Bipolaris sorokiniana* em meio de cultura de BAD incorporado com extrato de cogumelo e, comparado com meio de BAD. **Figura 3B**: Contagem do número de conídios $\times 10^6$ /mL. Resultados são médias de 3 repetições sem diferença significativa entre elas. Barras indicam desvio padrão.

4.2 Ensaios Prévios da Concentração do Indutor.

Para se determinar a concentração ideal do extrato a ser utilizada nos tratamentos como indutor, foi elaborado um teste prévio. O extrato de cogumelo apresentou a concentração de 1,2 mg de proteínas e 0,4mg de fenóis por 1 grama de cogumelo.

Para um extrato mais concentrado utilizou-se 2 gramas de cogumelo, obtendo-se 2,4mg de proteína. Um outro grupo foi preparado através da diluição chegando-se a 0,6mg de proteínas.

Tabela 1: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 contra o isolado *Bipolaris sorokiniana*, utilizando extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* (A)

Conc. do extrato	Tratamentos	Média n.folhas infectadas /10 plantas	% de proteção
2,4mg proteína	Testemunha (água)	0	--
	Suspensão conídio	15	0
	Controle (A)	0	--
	A-24H	3,1	78,2*
	A-48H	2,8	81,1*
	A-72H	2,3	84,5*
1,2 mg proteína	Controle (A)	0	--
	A-24H	3,12	79,2*
	A-48H	2,8	81,1*
	A-72H	2,4	84,2*
			80,5*
0,6mg de proteína	Controle (A)	0	--
	A-24H	5,2	65,4*
	A-48H	4,2	71,5*
	A-72H	2,9	80,5*

Os números representam média de um total de 10 plantas/tratamento ou 15 folhas no total.

* Médias seguidas por asterisco são significativamente diferentes das plantas infectadas pelo teste T (P<0,05).

No teste da indução nas plantas foi possível observar que o grupo de plantas de cevada tratado com extrato na concentração de 2,4mg de proteína, apresentou resultados semelhantes ao grupo de plantas com extrato 1,2mg de proteína (Tabela 1). Já o grupo com extrato de 0,6mg de proteína, as plantas obtiveram menor porcentagem de proteção (Tabela 1).

Sendo assim, para as próximas etapas foi utilizada a concentração de 1,2mg de proteínas para as pulverizações.

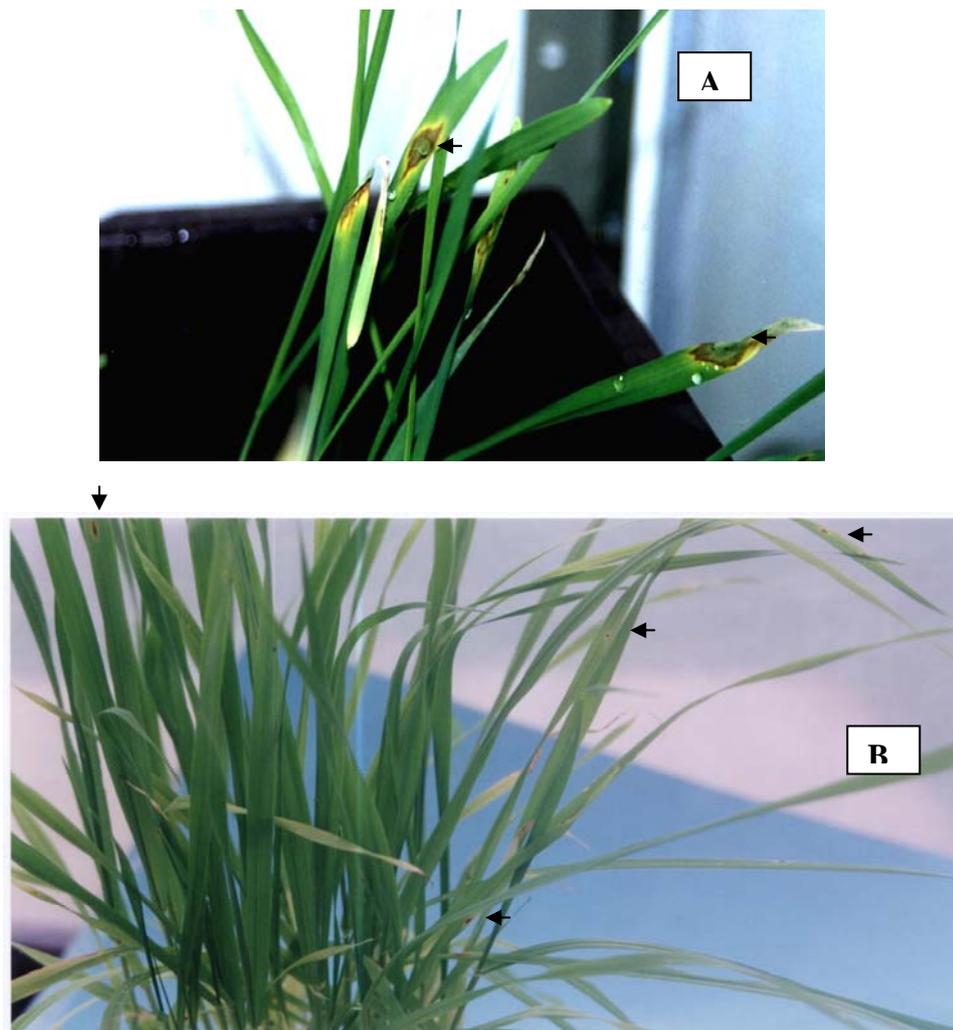


Figura 4: (A) Plantas infectadas com o patógeno ; (B) Plantas tratadas com extrato de cogumelo 24 horas antes do patógeno. Concentração do extrato 1,2mg de proteína (fotos do autor)

4.3 Tratamentos com Indução Local

Kuc (2001), descreveu a importância em se usar indutores de resistência ao invés de fungicidas, os quais contaminam o meio ambiente. Assim, foi utilizado como indutor o

extrato de cogumelo *Agaricus sylvaticus* em plantas de cevada infectadas com *Bipolaris sorokiniana*.

Tabela 2: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 e 195 contra o isolado *Bipolaris sorokiniana*, utilizando extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* (A)

Cultivares	Tratamentos	N. folhas com lesão	%de proteção
Embrapa 128	Testemunha (água)	0 *	--
	Suspensão conídio	60	0 b
	Controle (A)	--	--
	A-24H	18	70,0 a
	A-48H	11,3	81,2 a
	A-72H	9,0	85,0 a
Embrapa 195	Testemunha (água)	0	--
	Suspensão do conídio	58,8	2 b
	Controle (A)	--	--
	A-24H	15,9	73,5 a
	A-48H	14,1	76,5 a
	A-72H	11,4	81,0 a

*Média do número total de folhas com lesão em um lote de 60 folhas no total.
As Médias seguidas por letra são significativamente diferentes das plantas infectadas pelo teste T (P<0,05).

Nesta etapa foram utilizadas duas cultivares Embrapa 128 e 195 e, extrato de cogumelo *A. sylvaticus* apresentando 1,2mg de proteínas. Estas duas cultivares são as mais utilizadas no plantio do campo na região Sul do Brasil como Paraná e Rio Grande do Sul.

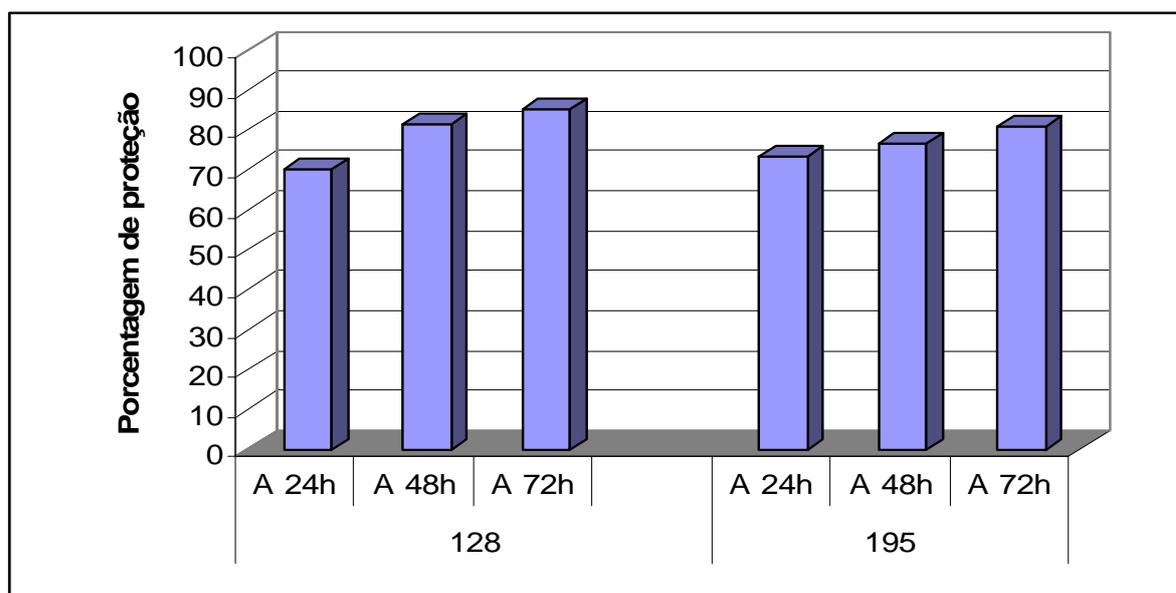


Figura 5: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada Emb 128 e 195 contra o isolado *Bipolaris sorokiniana*, utilizando extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* (A), nos diferentes intervalos de tempo. Tratamentos: A-24 h = plantas aspergidas com extrato e após 24 horas pulverizadas com suspensão de conídios; A-48 h = idem ao anterior, entretanto após 48 horas pulverizadas com o patógeno; A-72 h = idem ao anterior, entretanto após 72 horas pulverizadas com o patógeno.

Os resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 5, demonstraram que o indutor extrato de cogumelo, na concentração de 1,2mg de proteína, foi capaz de induzir resistência nas duas cultivares de cevada, apresentando uma porcentagem de proteção entre 70 a 85%, aumentando em função do tempo (24, 48 e 72 horas), entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno. Os resultados envolvendo a indução com o intervalo de tempo vieram ao encontro dos obtidos por Guzzo et al. (1993); Bach (1997); Bach et al. (2003b); Castro & Bach (2004).

Uma das diferenças observadas entre as duas cultivares foi que Embrapa 195 demorou mais dias para apresentar as lesões foliares enquanto que, a cultivar Embrapa 128 apresentou lesões maiores em menor tempo. Por este motivo a cultivar 195 inoculada com o patógeno apresentou 2% de proteção. A Figura 5, demonstra o aumento da proteção de 24horas (70%) a 48horas (81%) para plantas Embrapa 128 enquanto que na cultivar 195 o aumento foi menor isto é: 24h (73%) e 48h (76%). No período de 48 a 72horas, o aumento foi diferente chegando a cultivar Embrapa 128 a 85% e, Embrapa 195 a 81%. Dessa forma na Embrapa 195 o aumento foi linear enquanto na Embrapa 128 não foi totalmente linear indicando que a cultivar 195 apresenta um mecanismo próprio de resistência, demorando a apresentar o efeito de indutor de resistência.

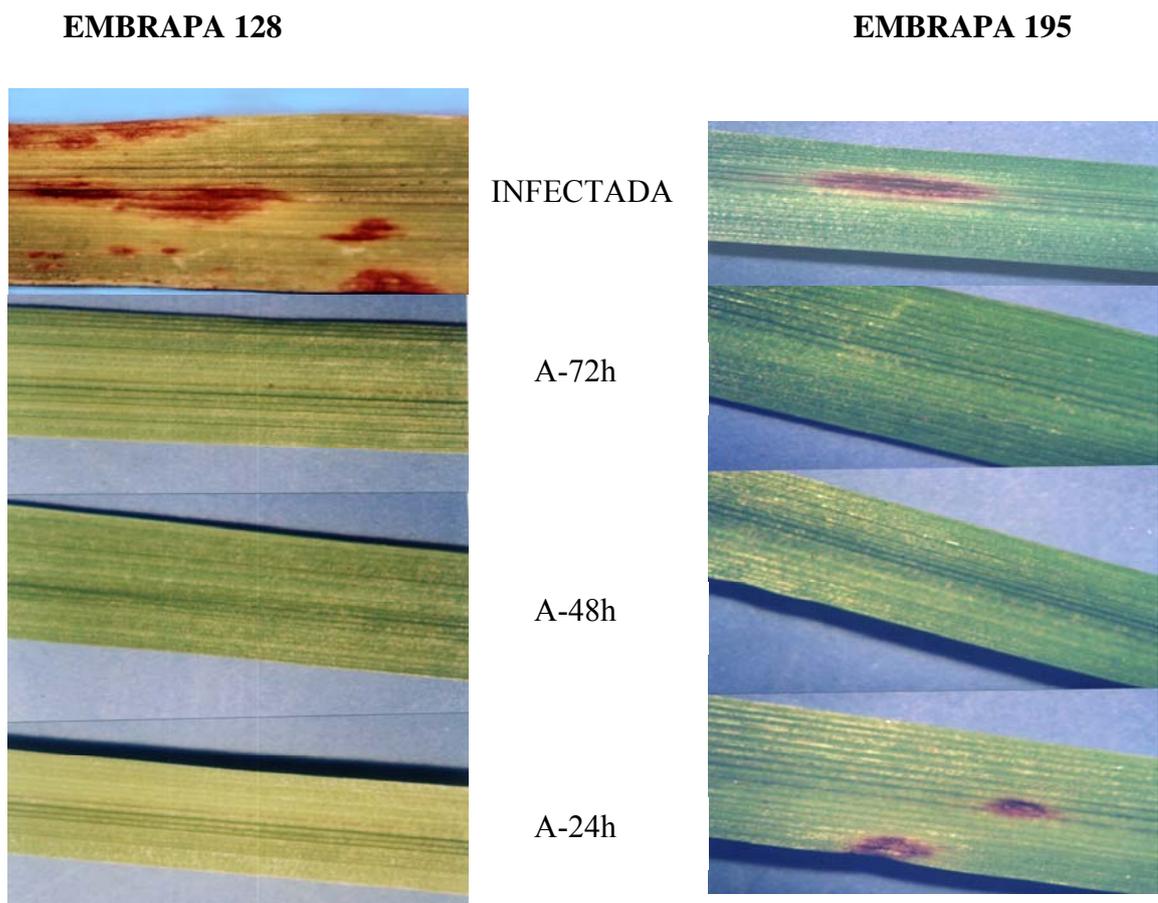


Figura 6 : Aspecto visual das folhas de cevada cultivares Embrapa 128 e 195 oriundas dos tratamentos (de cima para baixo): infectadas, tratadas A-24h; A-48h; A-72h (fotos do autor).

4.4 Indução de Proteção Sistêmica

Como foi observada a indução de proteção local para as duas variedades, verificou-se a indução sistêmica somente para a cultivar Embrapa 128 por ser esta a mais suscetível. A realização do efeito sistêmico tem a finalidade de otimizar o trabalho no campo, não necessitando da pulverização em todas as folhas. A proteção das plantas foi avaliada 04 dias após a inoculação do patógeno.

Os resultados oriundos dos tratamentos com extrato de cogumelo demonstraram proteção sistêmica tanto para a fase ascendente, no caso das plantas que receberam tratamento somente 2º folha, como para a fase descendente, em plantas que receberam tratamento

somente na 1º folha, promovendo proteção entre 56-100%, conforme demonstra a Tabela 3 e a Figura 7. Estes resultados também foram observados por Castro, 2003 utilizando como indutor a goma xantana.

Tabela 3: Porcentagem de proteção sistêmica em plantas de cevada tratadas com indutor extrato de cogumelo.

Cultivares	Tratamentos	% de proteção *
Embrapa 128	Testemunha (água)	---
	Suspensão conídio	0 a
	Controle (A)	---
	sist 24h 1FT 1F	75b
	sist 24h 1FT 2F	79,4
	sist 24h 2FT 1F	70b
	sist 24h 2FT 2F	56b
	sist 48h 1FT 1F	96b
	sist 48h 1FT 2F	100b
	sist 48h 2FT 1F	76b
	sist 48h 2FT 2F	70b
	sist 72h 1FT 1F	96
	sist 72h 1FT 2F	100
	sist 72h 2FT 1F	90b
	sist 72h 2FT 2F	85b

* % de proteção em 25 folhas de cevada submetidas a tratamento com indutor via sistêmica.

Números seguidos por letra b, são significativamente diferentes das plantas infectadas, pelo teste T ($P < 0,05$).

Tratamentos: sist-24h 1FT, sist-48h 1FT, sist-72h 1FT: Folha aspergida com extrato de cogumelo apenas na folha 1 e, após a o intervalo de tempo (24h, 48h, 72h) aplicado a suspensão de conídios em toda planta e analisada somente a folha no qual não foi tratada. sist-24h 2FT, sist-48h 2FT, sist-72h 2FT: Folha aspergida com extrato de cogumelo apenas na folha 2 e, após a o intervalo de tempo (24h, 48h, 72h) aplicado a suspensão de conídios em toda planta e analisada somente a folha no qual não foi tratada.

Folhas coletadas para análise: 1F= primeira folha; 2F= segunda folha

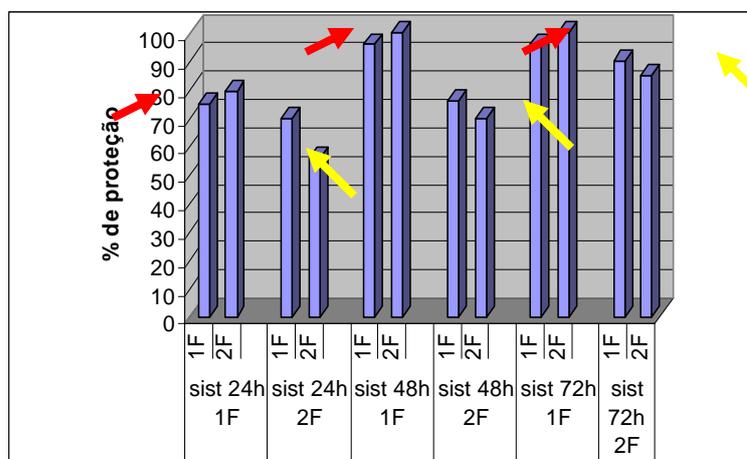


Figura 7: Porcentagem de proteção em folhas de cevada submetidas a tratamento com extrato de cogumelo. Setas vermelhas indicam efeito ascendente (folha 1 envia mensagem para folha 2) e, setas amarelas efeito descendente (folha 2 envia mensagem para folha 1)

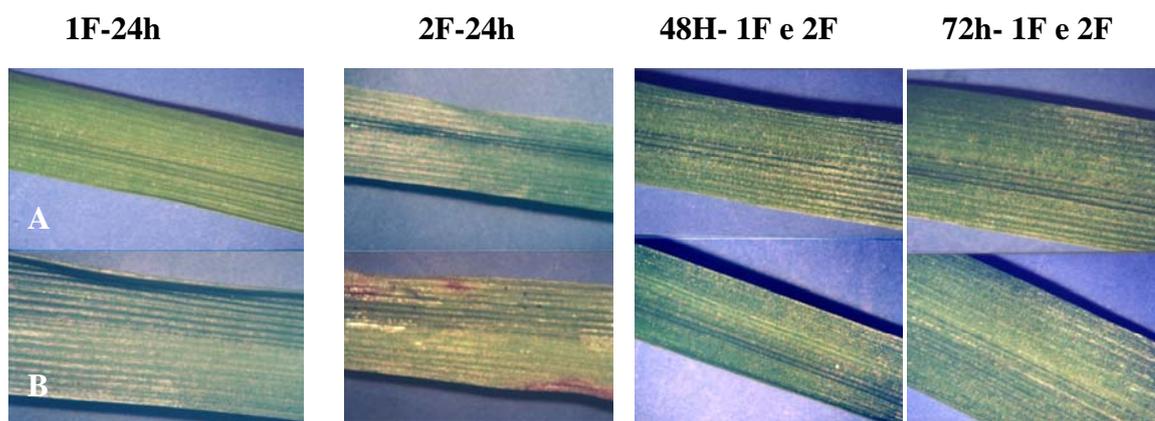


Figura 8 : Aspecto visual das folhas de cevada submetidas a tratamento sistêmico. Tratamentos: 1F-24h: 1Folha tratada e retiradas a 1F (A) e 2F (B); 2F-24h: 2F tratada e retiradas a 1F (B) e 2F (A); 48h -1F (A) 1F tratada e retirada a mesma folha com aspecto igual na segunda folha e, 48h- 2F (B) tratada e retirada folha 2 com aspecto igual na primeira folha; 72h -1F (A) 1F tratada e retirada a mesma folha com aspecto igual na segunda folha e, 72h- 2F (B) tratada e retirada folha 2 com aspecto igual na primeira folha (fotos do autor).

4.5 Análises Bioquímicas

Segundo Moraes (1991), algumas substâncias químicas ocorrem livres nos espaços intercelulares de certos tecidos vegetais, substâncias estas, produzidas pelas próprias células e associadas às paredes celulares. Essas substâncias são polissacarídeos, glicoproteínas, proteínas, que podem ser liberadas para o espaço intercelular na íntegra ou na forma de resíduos terminais. No instante em que o patógeno penetra no hospedeiro, deve ocorrer o reconhecimento dos determinantes específicos presentes nas paredes celulares do patógeno, através das macromoléculas de alta especificidade existentes nas células do hospedeiro. Quando provocadas por agentes bióticos ou abióticos, as plantas respondem alterando seu metabolismo, aumentando ou diminuindo a concentração de alguns metabólitos ou macromoléculas bioquímicas, ou ainda, produzindo outros, que estejam relacionados com a reação de resistência, como por exemplo, as PR-proteínas, os fenóis, as fitoalexinas, dentre outros (FRY, 1986; KUC, 1993, 2001; BENHAMOU, 1996; KOMBRINK & SCHMELZER, 2001).

4.5.1 Indução de Proteção Local.

Nos extratos foliares dos tratamentos de proteção local observou-se que a quantidade de proteína total encontrada na cultivar Embrapa 195 foi maior do que a cultivar Embrapa 128 quando observados os extratos de planta sadia e extrato de plantas controles tratadas com o elicitor cogumelo (Figura 9). O mesmo pode ser observado com atividade beta-glucanase por ser esta maior na cultivar Embrapa 195 do que na cultivar Embrapa 128 (Figura 10).

Entretanto, observando as plantas submetidas a tratamento com elicitor, tem-se aumento gradativo nos intervalos de tempo nas duas cultivares mas, na cultivar Embrapa 195 a quantidade de proteínas bem como a atividade enzimática foi maior do que na cultivar Embrapa 128. Isto vem demonstrar, que as duas cultivares apresentam variabilidade genética entre si, tendo assim alterações metabólicas também diferentes entre si (Figuras 9-10).

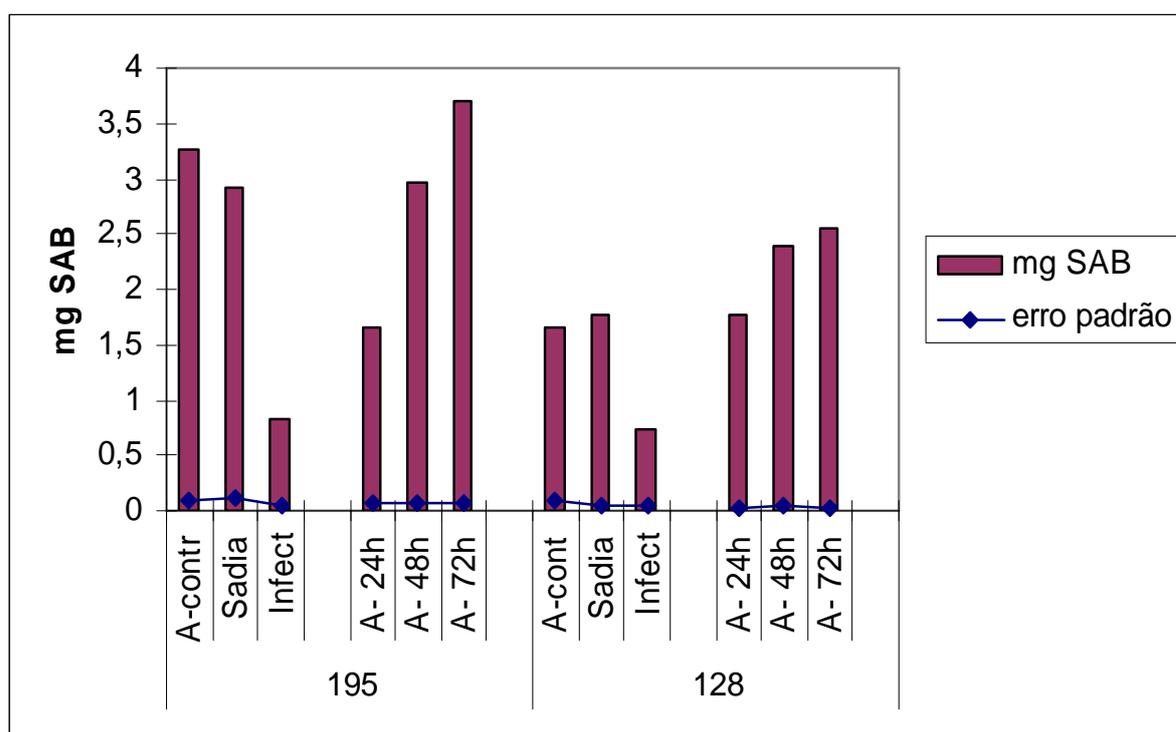


Figura 9: Quantidade de proteínas em mg de SAB (soro albumina bovina) presente em folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra *Bipolaris sorokiniana*.

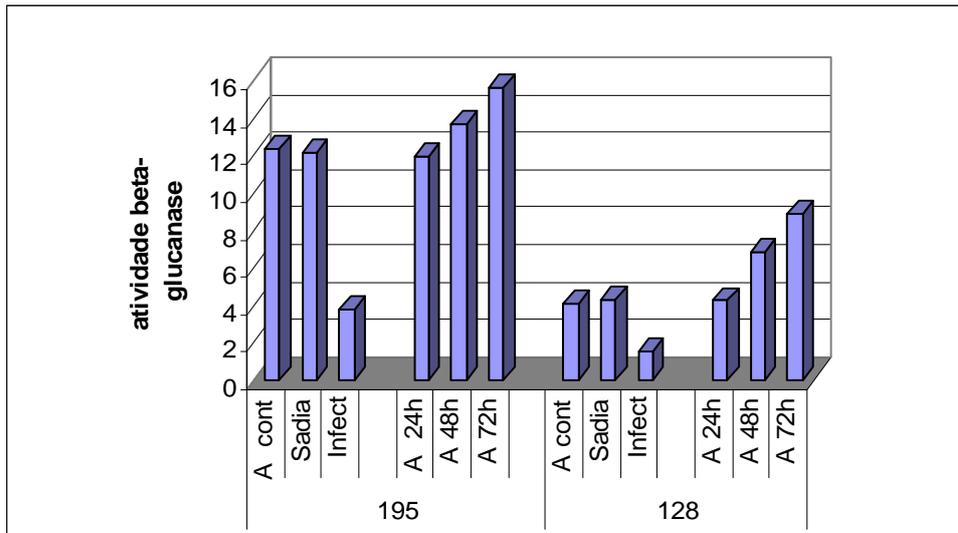


Figura 10: Atividade da beta glucanase presente em folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra *Bipolaris sorokiniana*.

Os resultados observados vêm ao encontro dos observados por Bach (1997), onde se constatou aumento de proteínas após indução de resistência utilizando goma xantana em plantas de trigo. A concentração de proteínas observada nas plantas após infecção com o patógeno, vem ao encontro do observado por Bach et al. (1993) envolvendo interações entre sorgo e capim elefante com *Exserohilum turcicum*. Para a atividade da enzima beta-1,3 glucanase o aumento nas plantas tratadas também foi observado na interação trigo-*B. sorokiniana* (BACH et al., 2003a), e na interação cevada-*B. sorokiniana* utilizando elicitor goma xantana (CASTRO & BACH, 2004).

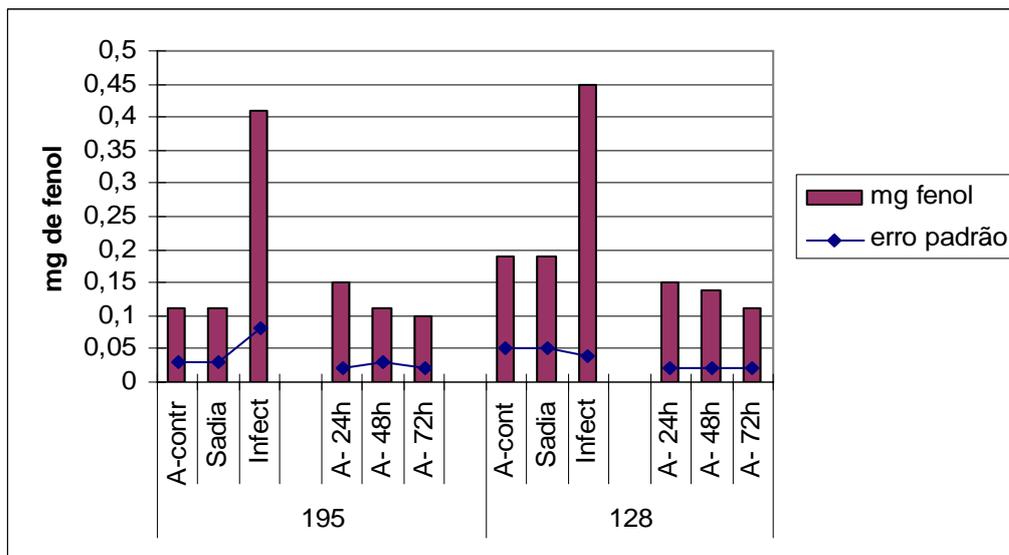


Figura 11 : Concentração de fenol, baseado em mg de ácido clorogênico, presentes em extrato de folhas de plantas de cevada tratadas com extrato de cogumelo contra *Bipolaris sorokiniana*.

As plantas de cevada, nas duas cultivares Embrapa 128 e Embrapa 195, inoculadas com o patógeno e denominadas de infectadas apresentaram a maior concentração de fenol estando de acordo com os resultados observados por Oku (1964) em plantas de arroz infectadas, e, por Bach (1997) em plantas de trigo infectadas com *B. sorokiniana*, *D. tritici-repentis* ou *B. bicolor*.

Nas plantas das duas cultivares, submetidas a tratamento com extrato de cogumelo, a concentração de fenóis foi menor do que nas infectadas, entretanto ficando com a concentração no mesmo patamar que as plantas sadias e as controles (plantas sadias submetidas a extrato) (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com Bach (1997), Bach et al (2003), Rodrigues et al. (2002) e Castro & Bach (2004). Segundo Bach (1997), algum mecanismo foi ativado a fim de diminuir a concentração de fenóis podendo estar associado com a indução de resistência.

Comparando os resultados de concentração de fenóis e atividade beta glucanase nas plantas de cevada, pode-se observar que cultivar Embrapa 128 apresenta menos enzima do que a cultivar Embrapa 195. No caso de fenóis, a concentração nas plantas tratadas foi menor do que nas infectadas isto para as duas cultivares (Figura 12).

Diante dos resultados de proteção local, por ser a cultivar Embrapa 128 mais suscetível e a mais encontrada nos plantios de cevada, esta foi utilizada nos testes de indução sistêmica.

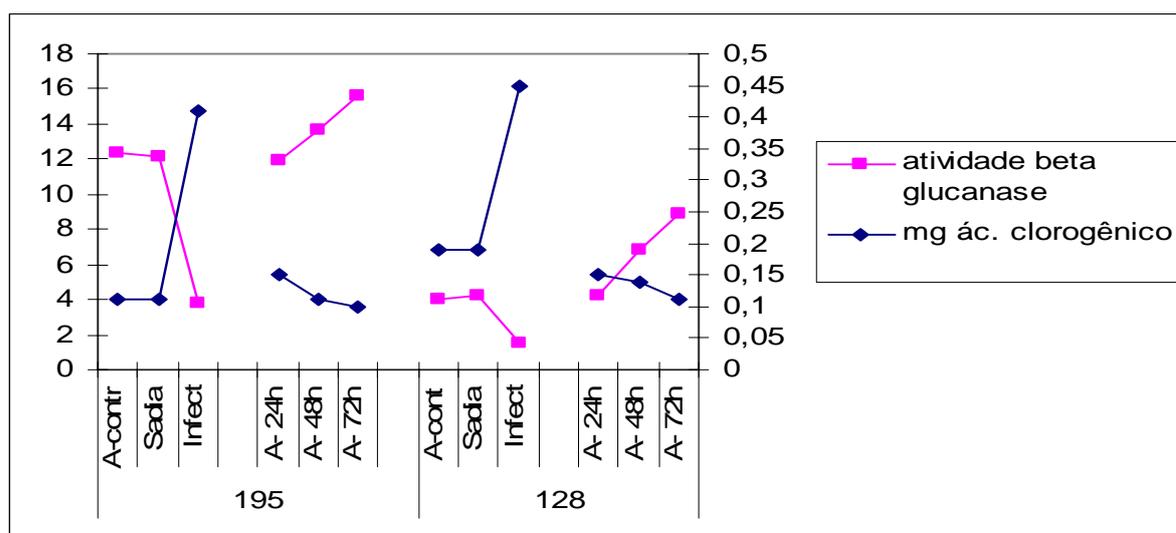


Figura 12: Comparação das cultivares em relação a atividade da beta glucanase e na concentração de fenóis (ácido clorogênico) presentes nas plantas de cevada sadias, controles e tratadas com extrato do cogumelo.

4.5.2 Indução de Proteção Sistêmica

A indução de proteção teve efeito tanto na fase ascendente como na fase descendente. Em relação às análises bioquímicas pode-se observar um aumento na atividade beta glucanase como também em proteínas quando comparado com plantas infectadas ou sadias ou ainda controles. Para fenóis, a concentração nas plantas tratadas não apresentou variação, indicando que alguma molécula sinalizadora transcorreu pela planta sem danificar células (Figura 13).

O efeito ascendente e descendente concorda com os resultados observados por Castro & Bach (2004) quando utilizaram cevada e goma xantana como elicitor.

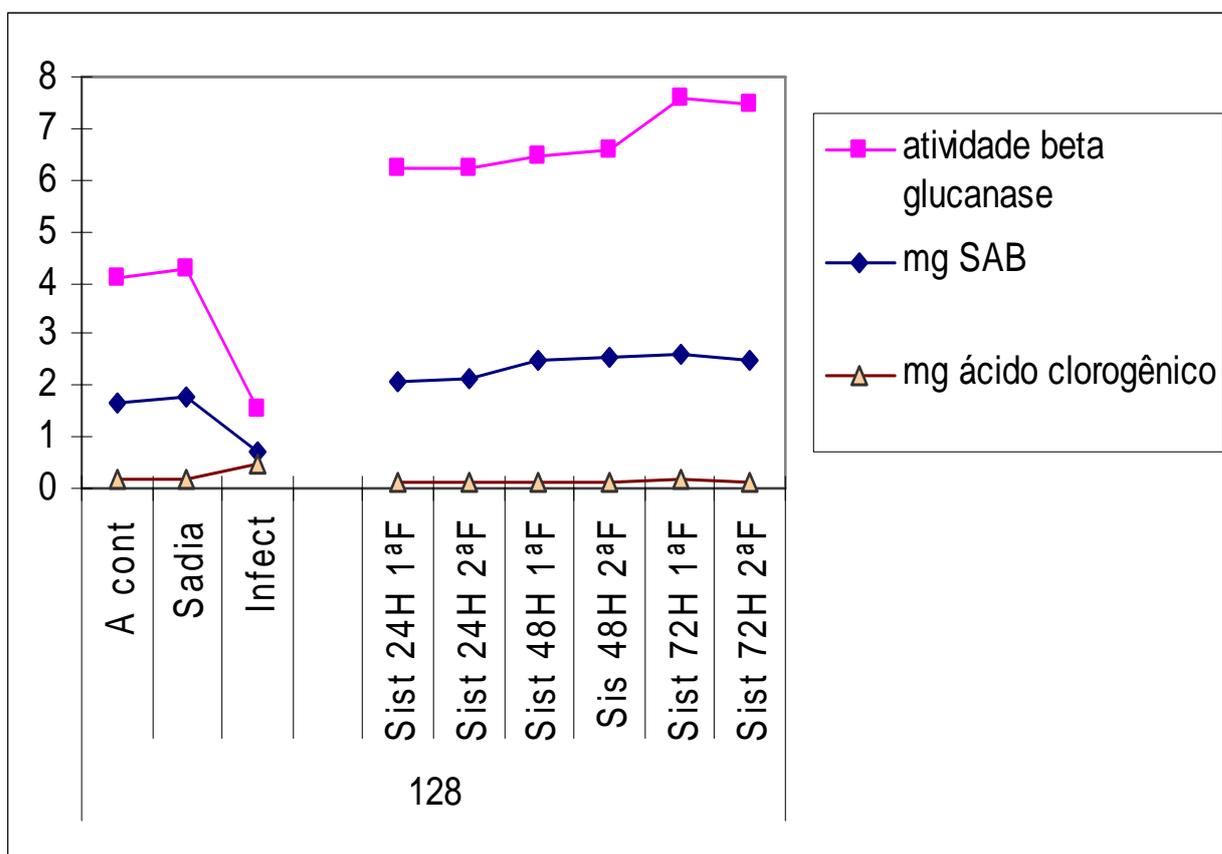


Figura 13: Quantificação de proteínas, fenóis e atividade beta-glucanase de plantas de cevada tratadas sistemicamente com extrato de cogumelo.

4.6 Tratamento das Plantas com Ópera

Ópera é produzido por duas substâncias, Piraclostrobin (133g/L) acrescido de Epoxiconazol (50g/L) formando uma suspensão. O Epoxiconazol tem sido acrescido ao Ópera, pois atua com efeito sistêmico dentro da planta.

O Piraclostrobin apresenta a estrutura das estrobilurinas que foram extraídas de fungos presentes no pinho conhecido como *Strobilurus tenacellus*. Entretanto a estrutura química extraída apresentou como obstáculo por ser instável perante a luz. Desta forma a Basf procurou aprimorar a substância química como sendo um fungicida denominado como família F500. O mecanismo de ação do produto foi conhecido como indutor de resistência e fungicida.

Tabela 4: Porcentagem de proteção nos diferentes tratamentos para a verificação da atuação do fungicida ópera

Variedades	Tratamentos	Nº total de folhas / Nº de folhas com lesões	% de proteção
Embrapa 128	A+fungo	50/0	100
	A+ópera+fungo	50/0	100
	Infectada	50/50	0
	Ópera+fungo	50/0	100
Embrapa 195	A+fungo	50/9,5	81
	A+ópera+fungo	50/10	80
	Infectada	50/0	0
	Ópera+fungo	50/11,1	78

Tratamentos: A + fungo: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o extrato de cogumelo, sendo após 48 horas pulverizadas com o fungo; A + ópera + fungo: grupo de plantas com 14 dias de germinação, submetidas a pulverização com o extrato de cogumelo, após 10 dias, pulverizadas com o fungicida ópera, sendo após 72 horas pulverizadas com o fungo; Infectada: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o fungo; Ópera + fungo: grupo de plantas com 24 dias de germinação, submetidas a pulverização com o fungicida ópera, sendo após 72 horas pulverizadas com o fungo.

A porcentagem de proteção nas plantas de cevada variedade 128 submetidas ao tratamento com o extrato do cogumelo+fungo e com o produto ópera foi de 100%, indicando que tanto o Ópera quanto o cogumelo apresentaram o mesmo efeito. Na variedade Embrapa 195, a porcentagem de proteção nas plantas que receberam extrato ou ópera apresenta proteção de 78 a 81%. Mesmo sendo pequena a variação da porcentagem de proteção nesta variedade Embrapa 195 pode-se dizer que a proteção ocorreu tanto com o fungicida opera tanto quanto com o cogumelo (Tabela 4).

Observando as análises bioquímicas foi possível constatar que plantas tratadas com o cogumelo e/ou ópera apresentaram as mesmas alterações bioquímicas como aumento de enzima beta-glucanase, proteínas e diminuição de fenóis quando comparado com plantas infectadas. Entretanto, para plantas tratadas com o cogumelo/ópera ou somente ópera a beta-glucanase diminuiu quando comparada com plantas tratadas somente com o cogumelo. Isto vem indicar que o cogumelo tem uma ação mais enérgica nas plantas de cevada do que com o ópera apenas (Tabela 5). Em relação à quantidade de proteínas as plantas submetidas ao tratamento com o cogumelo apresentaram maior aumento do que com o produto ópera e mantendo-se a concentração de fenóis.

Tabela 5: Quantidade de proteínas (mg SAB), de enzima beta-1-3-glucanase (μmol de glicose/min) e de fenóis (mg ácido clorogênico), presentes nos extratos foliares de plantas de cevada, submetidas aos diferentes tratamentos com o fungicida Ópera.

Cultivares	Tratamentos **	Proteínas MgSAB	Beta glucanase Atividade enzimática	Fenóis mg ácido clorogênico
Embrapa 128	A 48h	2,96 b	0,92 b	0,14 b
	A 48h +opera	1,98 b	0,74 b	0,13 b
	opera	2,03 b	0,73 b	0,15 b
	Infectada	0,40 a	0,20 a	0,45 a
Embrapa 195	Sadia	1,90 b	0,75 b	0,18 b
	A 48h	2,78 b	14,0 b	0,12
	A 48h+ opera	2,03 b	13,5 b	0,14
	opera	2,26 b	10,2 b	0,14
	Infectada	0,83 a	3,7 a	0,41
	Sadia	2,91 a	12,2 b	0,11

4.7 Eletroforeses das Plantas Tratadas

Na figura 14 é possível observar que em todas as cultivares, as plantas inoculadas com suspensão de conídios, apresentaram diminuição na intensidade de bandas, além de desaparecimento de algumas delas, quando comparadas com as plantas saudáveis. Já com as plantas submetidas ao tratamento com extrato de cogumelo, é possível visualizar aumento na intensidade das bandas.

A variedade Embrapa 128 apresentou 4 bandas de isoenzimas de esterase sendo que ocorre aumento da atividade nas bandas dependendo do tempo de tratamento. Isto é, no intervalo de tempo de 72 horas todas as bandas correspondentes a isoenzimas de esterase apresentam coloração mais forte, que corresponde a maior atividade do que, quando comparado com 24 e 48h.

Entretanto, na variedade 195, ocorreu a presença de 3 bandas de isoenzimas de esterase sendo possível visualizar que nas bandas referentes a 72h do tratamento as atividades isoenzimáticas foram maiores.

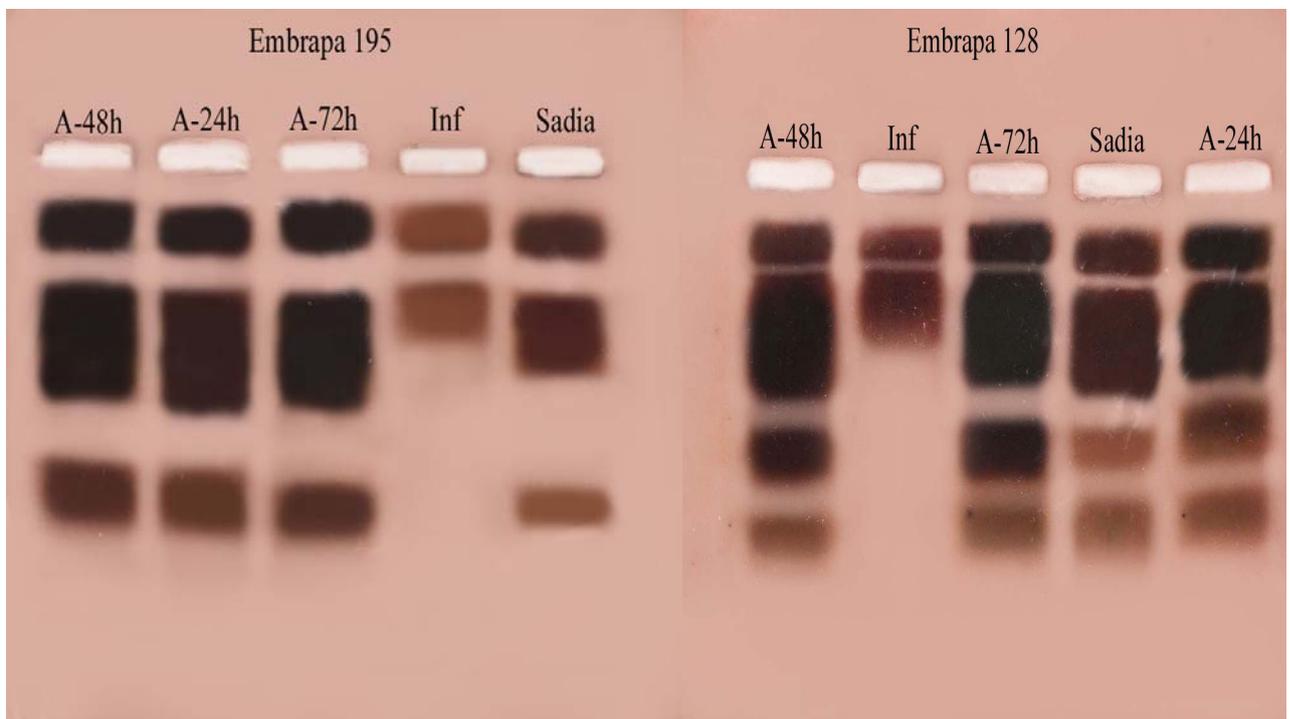


Figura 14: Eletroforese de isoenzimas de esterase das variedades Embrapa 128 e 195, nos diferentes intervalos de tempo.

A (Figura 15) apresenta a eletroforese da cultivar 128 via sistêmica, perante tratamento com extrato de cogumelo envolvendo tratamento na primeira e segunda folha. Foi possível observar na eletroforese do efeito sistêmico que o número de bandas das folhas tratadas 1, 2, 3 e 4, foram iguais quando comparada com as plantas saudias entretanto, a maior atividade foi visualizada no intervalo de tempo de 72h.

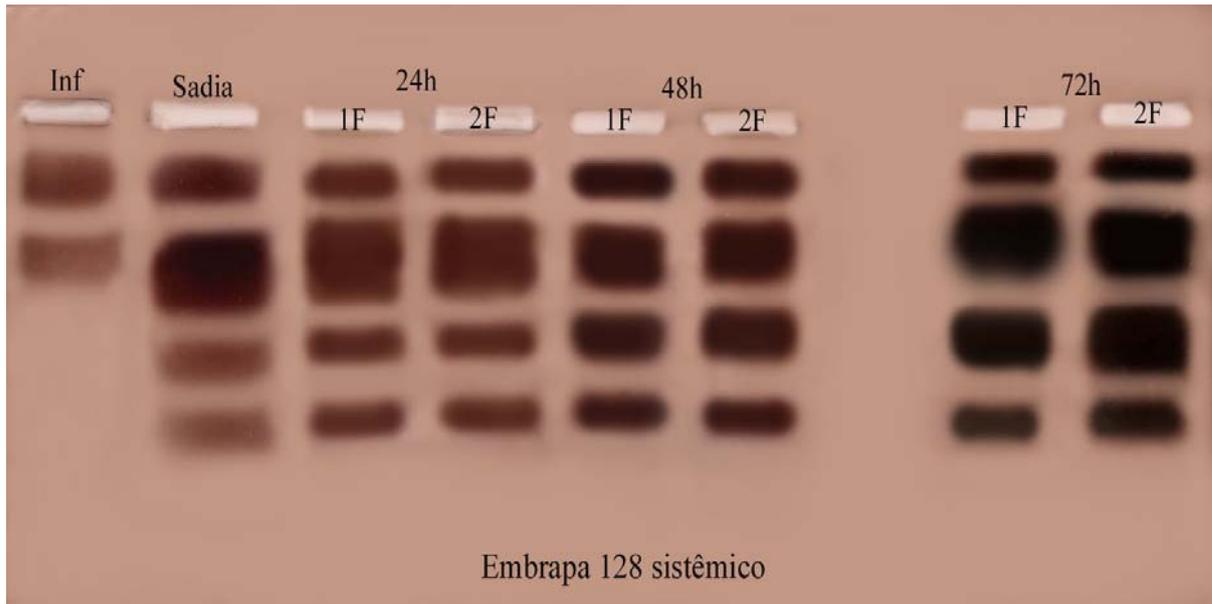


Figura 15: Eletroforese de isoenzima de esterase da variedade Embrapa 128 com os tratamentos sistêmicos, nos diferentes intervalos de tempo. 1F=primeira folha tratada e retirada a segunda folha; 2F= segunda folha tratada e retirada a segunda folha.

A atividade da enzima esterase foi observada não só a olho nu como analisada através do programa Analista Molecular da Biorad acoplado ao computador, sendo as bandas representadas em valores de absorbância x área indicada na densitometria (Figuras 16-17).

A mobilidade eletroforética associada a atividade enzimática indica que bandas 1,2,3 e 4 devem estar ligadas a reação de resistência para a variedade Embrapa 128. Entretanto, ao observar a planta infectada, com apenas duas bandas, a banda 1 e 2 diminuem a atividade enzimática pois não apresenta a reação de indução de resistência (Figura 16).

A variedade Embrapa 195, apresentou nas plantas saudias e tratadas apenas 3 bandas. Esta variedade possui em campo uma resistência em que nos primeiros estádios de desenvolvimento não apresenta sintomas da doença. Assim, pode-se verificar que os gens presentes na planta são diferentes da outra variedade. Sendo assim, esta variedade apresentou 3 isoenzimas de esterase mas, ao ser infectada passou também a ter 2 isoenzimas.

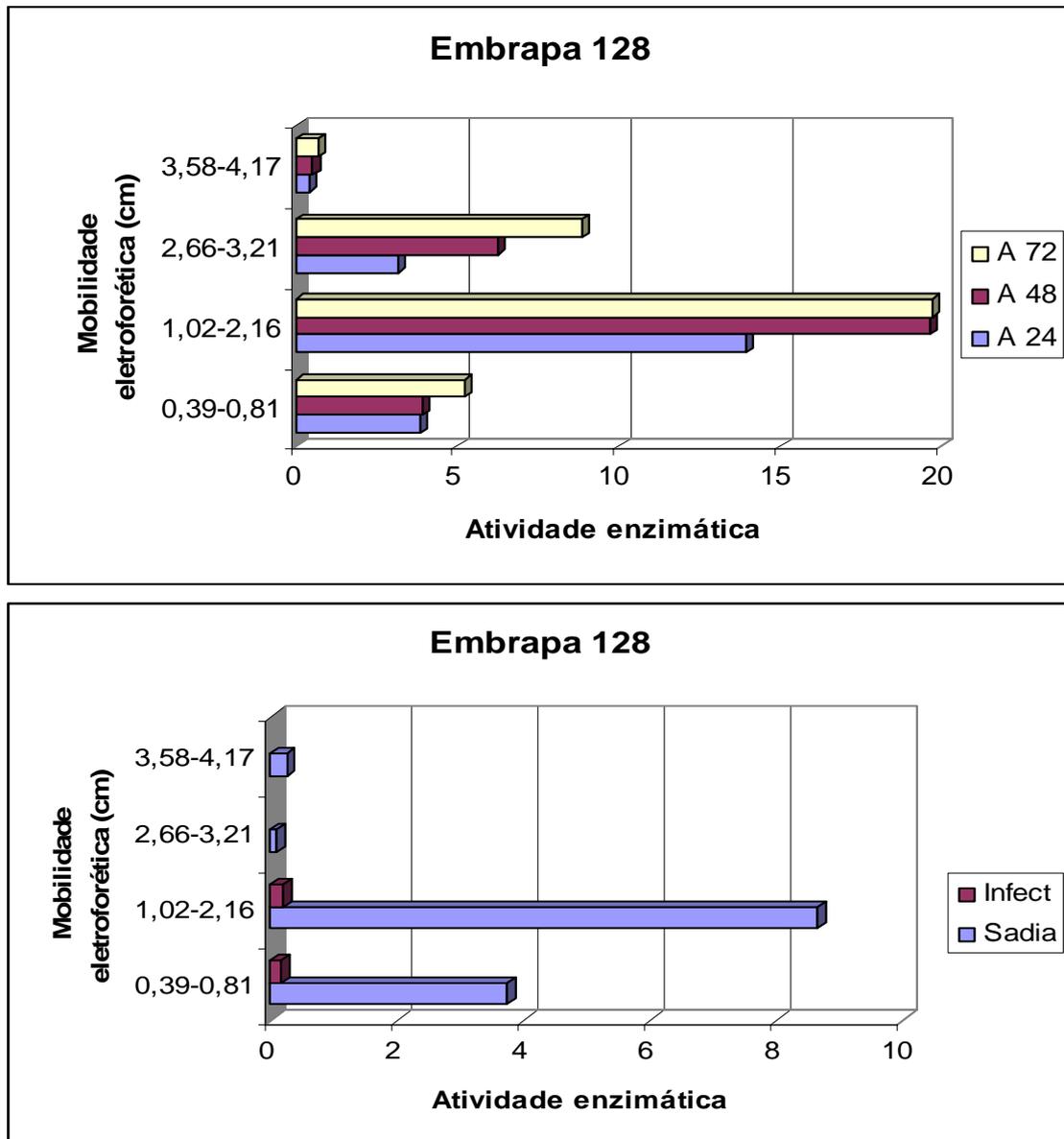


Figura 16: Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 128) submetidas aos tratamentos.

Nas plantas infectadas as bandas 1 e 2 tiveram diminuição na atividade, enquanto a banda 3 desapareceu (Rm 2,9-3,41) (Figura 17). Diante disto, pode-se confirmar que as bandas de isoenzimas diminuem. Isto porque a planta tenta se defender digerindo a parede do fungo, mas por haver baixa concentração de enzimas, não consegue reagir. Nas plantas tratadas, como a isoenzima aumenta, é possível ver a resistência.

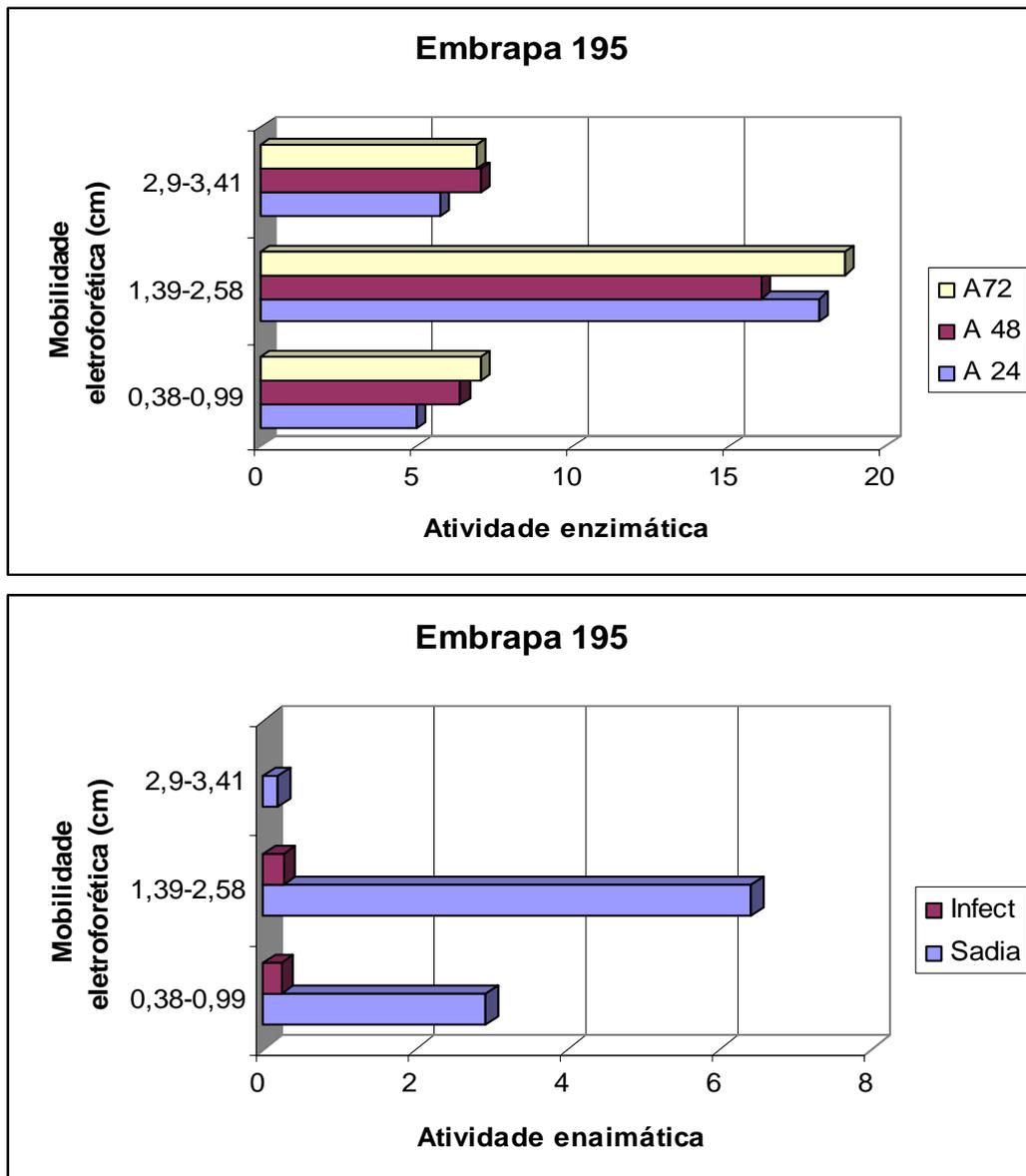


Figura 17: Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 195) submetidas aos tratamentos.

Os tratamentos sistêmicos apresentaram na variedade 128 também 4 bandas, confirmando a indução de resistência local, na qual plantas infectadas tiveram somente 2 isoenzimas de baixa atividade, enquanto as plantas saudáveis apresentavam com 4 isoenzimas (Figura 18).

As plantas submetidas ao tratamento sistêmico apresentaram 4 isoenzimas, com atividade diferente, dependendo do intervalo de tempo entre as aplicações. No intervalo de 72 horas a atividade enzimática foi maior (Figura 15).

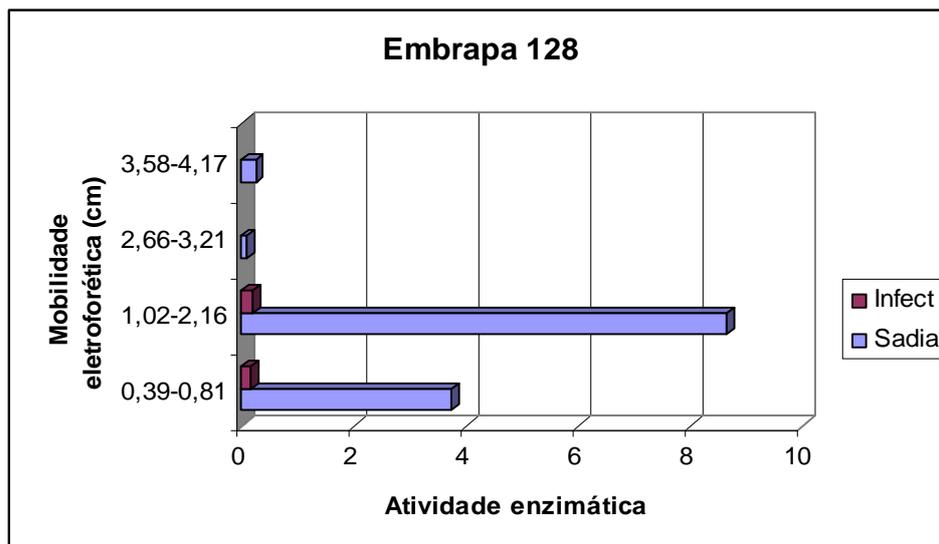
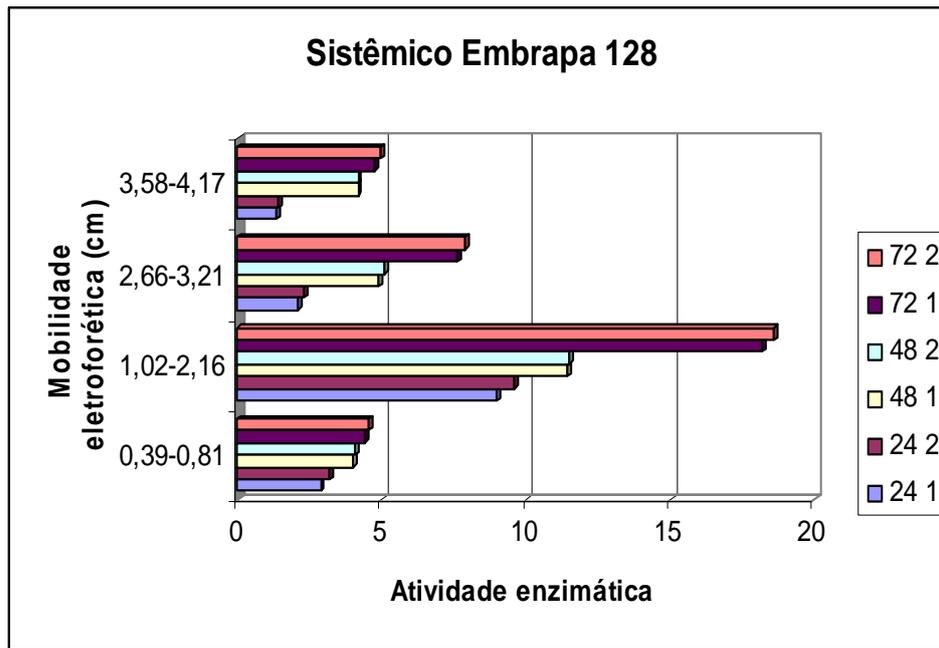


Figura 18: Densitometria das amostras de plantas de cevada (variedade Embrapa 128) submetidas aos tratamentos sistêmicos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. No teste biológico, incorporando o extrato em meio de cultura de BAD, pode-se observar redução do crescimento micelial quando comparado com o controle mas, em relação à produção de conídios a alteração foi muito pequena indicando que possivelmente o extrato não apresenta efeito como fungitóxico sobre o fungo.
2. O extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* atuou como elicitador de resistência em plantas de cevada (variedades Embrapa 128 e Embrapa 195) contra o fungo *Bipolaris sorokiniana* na concentração de 1,2mg de proteínas e 0,4mg de fenóis.
2. Plantas de cevada tratadas com o extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* 72 horas antes da inoculação do patógeno *Bipolaris sorokiniana*, apresentaram maior percentual de proteção em relação às plantas de cevada submetidas ao mesmo tratamento com intervalos de tempo de 48 e 24 horas.
3. A resistência induzida em plantas de cevada foi local e sistêmica, sendo que na resistência sistêmica, a fase ascendente apresentou maior proteção do que a fase descendente.
4. A indução de resistência foi comprovada por análises bioquímicas, com o aumento de proteínas, enzima beta-glucanase nas plantas tratadas, bem como diminuição de fenóis. Já nas plantas submetidas à infecção com o fungo, foi constatado aumento na quantidade de fenóis e diminuição na quantidade de proteínas e enzima beta-glucanase. As análises eletroforéticas demonstraram que em plantas infectadas houve diminuição na atividade esterásica, enquanto nas submetidas ao tratamento, a atividade esterásica apresentou-se maior.
5. O extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* demonstrou ser indutor de resistência local e sistêmica, permitindo assim, resposta de defesa semelhante a verificada na utilização do Ópera.

Perspectivas Futuras

Purificar o extrato na tentativa de isolar o princípio ativo, o qual poderá servir de base para obtenção de moléculas de interesse fitopatológico.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York, Academic Press. 1997.
- ALEXOPOULOS, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. **Introductory Mycology**. 4ed. New York, John Wiley & Sons. 758p. 1996.
- ANDREU, A.; TONÓN, C.; VAN DAMME, M.; HUARTE, M.; DALEO, G. Effect of glucans from different races of *Phytophthora infestans* on defense reactions in potato tuber. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 777-783, 1998.
- BACH, E. E.; KIMATI, H.; LEME, A. C.; ALCANTARA, V. B. G.; ALCANTARA, P. B.; VEASEY, E. A. Biochemical changes in *Pennisetum purpureum* leaves infected with *Exserohilum turcicum*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, p.93-95, 1993.
- BACH, E. E. **Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris* spp.** E *Dechslera 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.; 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.
- 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, 2003a.
- BACH, E. E.; RODRIGUES, E.; SILVA, A. O.; ANTONIAZZI, N. Patogenicidade e eletroforese de isolados de *Bipolaris sorokiniana* em trigo e cevada. XXIII REUNIÃO DE PESQUISA EM CEVADA, 2003, PASSO FUNDO. **Anais e Ata Embrapa**.23: 539-555, 2003b
- BACH, E. E. & KIMATI, H. Purification and characterization of toxins from wheat isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 5, p. 184-199, 1999.
- BACH, E.E. Fungos comestíveis com visão medicinal. **Ervas & Plantas** (Geração Saúde), n.12,28-30, 2005.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Tren. Plant Sci.**, Oxford, v.1, n.7, p.233-240, 1996.
- BENHAMOU, N.; GARAND, C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Phytopathology**, v.91, n.8, p.730-740, 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.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, v.197, p.89-102, 1995.

BENHAMOU, N; THÉRIAULT, G. Treatment with chitosan enhances *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Physiol. Mol. Plant Pathol**, New York, v. 41, p.33-52,1992.

BERNARD, N. Remarques sur l'immunité chez les plantes. **Bul. Inst. Pasteur**, Paris, v. 7, 369 p., 1909.

BOLCH, C.B.; DEWIT, J.M.; KUC, J. Elicitation of phytoalexins by arachidonic acid eicosapentaenoic acids: a host survey. **Physiological Plant Pathology**, New York, 25: 199-208, 1984.

BOLLER, T. Ethylene and plant-pathogen interactions. **Curr. Top. Plant Physiol.** 5:138-145, 1990.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** V. 46, p. 189-214, 1995.

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

BRUM, A. A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos.** 117 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CACE MILTON PAIVA/SISTEMA ALICE/SERPRO/MDIC-DECEX. **Exportação de Cogumelo no Brasil.** 2001 e 2004. Gráfico.

CANTRELL, S.A; LODGE, D. J. 2001. Hygrophoraceae (Agaricales) of the Greater Antilles: *Hygrocybe* subgenus *Pseudohygrocybe* section *Firmae*. **Mycol. Res.** 105(2):215-224. Halling, R.E. **A new species of *Boletus* section *Luridi* from Colombia.** *Brittonia*, 44(3): 322-325, 1992.

CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, A.S. & DONG, X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell** 6:1583-92, 1994.

CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARKE, J.D.; VOLKO, S. & DONG, X. **The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats.** *Cell* 88:57-63, 1997.

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 conídios inativos pelo calor como indutores de resistência em cevada contra *Bipolaris sorokiniana***. Tese de Doutorado. Unesp Araquara, 2003, 80p.

CASTRO, O. L.; ANTONIAZZI, N.; BACH, E. E. Efeito da goma xantana em planta de cevada (variedade Embrapa 129) no controle de *Bipolaris sorokiniana*. In: **Reunião Anual de Pesquisa de cevada**, 3, 2002, Passo Fundo. Anais e Ata... EMBRAPA, P.531-540, 2002.

CASTRO, O. L.; ANTONIAZZI, N.; FERRARI, e V. BACH, E.E.. Uso da goma xantana como indutor de resistência em plantas de cevada (variedades AF 94135 e EMBRAPA 128) contra *Bipolares sorikiniana*. In: **XXI Reunião anual da pesquisa de cevada**, 2, 2001, Guarapuava. Anais e ata... Garapuava: EMBRAPA, 2001, p. 559-56.

CASTRO, T. A. M. G. C. & BACH, E. E. Eletroforese na agricultura. **Zootecnia**, Nova Odessa, v.31, p.73-88, 1993.

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.

CHANG, S. T., BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 473-476, 1996.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus code protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 403-409, 2004.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Q. Rev. Biol**, v. 8, p.275-324. 1933.

COSTET, L.; CORDELIER, S.; DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n.8, p.655-662, 1999.

COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p.149-158, 2001.

CREELMAN, R.A.; TIERNEY, M.L.; MULLET, J.E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proceedings National Academia Science**, USA, 89: 4938-4941, 1992.

DAAYF, F.; BEL-RHLID, R.; BÉLANGER, R.R. Methyl ester of p-coumaric acid: A phytoalexin-like compound from long english cucumber leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.23, n.6, p.1517-1526, 1997.

DAAYF, F.; SCHIMITT, A.; BÉLANGER, R. R. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long english cucumber. **Plant Disease**, v.79, n.6, p.577-580, 1995.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, n.5, p. 315-327, 1995a.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of reduced penetration by *Colletotricum lagenarium* into cucumber leaves with induced systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, n.5, p. 329-338, 1995b.

DELANEY, T.P.; FRIEDRICH, L. & RYALS, J.A. 1995. **Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6602-6.

DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v. 496, p. 15-21, 2001.

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.

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

EBEL, J.A. et al. Elicitor-binding proteins and signal transduction In the activation of phytoalexin defense response. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, suppl. 1, p.506-510, 1995.

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

EGUCHI, F.; WATANABE, Y.; ZHANG, J.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUHARA, T.; & HIGAKI, M. Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Traditional Medicines**, v. 16, p. 201-207, 1999.

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 phytoalexin accumulation to local and systemic protection of bean against anthracnose. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlin, v. 89, p. 114-130, 1977.

EPA - United States Environmental Protection Agency. Messenger: A Promising Reduced Risk Biopesticide. **PESP** (Pesticide Environmental Stewardship Program) Update. v. 3, n. 1, 2000.

EVANS, I. J.; GREENLAND, A. J. Transgenic approaches to disease protection: applications of antifungal proteins. **Pesticide Science**, v.54, p. 353-359, 1998.

F-500. O Fungicida Premium. **Catálogo Basf**, 2005 ou www.basf.com.br

FAUTH, M.; MERTEN, A.; HAHN, M. G.; JEBLICK, W.; KAUSS, H. Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. **Plant Physiology**, v.110, n.2, p.347-354, 1996.

FARMER, E. E., and C. A. Ryan. Interplant communication: **Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:7713-7716, 1990.

FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p.396-401, 1998.

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.

FERREIRA, J.E.F. **Produção de Cogumelos**. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais. 2 ed. Botucatu, 1998, 115p.

FRY, S. C. Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases, In: Greppin, H.; Penel, C. & Gaspar, T.; (ed). **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. Universidade de Genève, p. 169-182, 1986.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H. & RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science** 261:754-6. 1993.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.;KOGEL, K.; 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. **The Plant Cell**, v.8, p.629, 1996.

GROSSKOPF, D. G., G. Felix, and T. Boller. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells. **J. Plant Physiol.** 138: 741-746,1991.

GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 301-309, 2004.

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 of Phytopathology**, Berlin, v.139, p.119-128, 1993.

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

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.1-6, 2001.

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.

HOFFLAND, E.; PIETERSE, C.M.J.; BIK, L. & VAN PELT, J.A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 46:309-20, 1995.

HONÉE, G. Engineered resistance against fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.319-326, 1999.

HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. **Antioxidant properties of *Agaricus blazei***. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>> Acesso em: 26 de janeiro de 2006

HUGHES, S. J. Conidiophores, conidia and classification. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 31 p.577-659, 1953.

HUANG, Q.; KUC, J. Cutin, cutinase and esterase as related to the induced systemic resistance of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, n.3, p.215-226, 1995.

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, n. 5, p. 305-322, 1997.

IWATA, M. PROBENAZOLE – A PLANT DEFENCE ACTIVATOR. **Pest icide Outlook**, The Royal Society of Chemistry , 28-31, 2001

IWATA, M.; Suzuki, Y.; Watanabe, T.; Mase, S.; Sekizawa, Y. Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in the rice plant. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **46**, 297–306, 1980.

JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Induction of different pathogenesis-related c-DNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethefon. **Plant Pathology**, v. 48, p.325-336, 1999.

KÄSTNER, B; TENHAKKEN, R.; KAUSS, H. Chitinase in cucumber hypocotyls is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. **The Plant Journal**, v.13, n.4, p. 447-454, 1998.

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.

KINKEMA, M.; FAN, W. & DONG, X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. **Plant Cell** 12:2339-50.

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, n.1, p.129-136, 2001.

KLOEPPER, J. W. JOSEPH W. KLOEPPER, Professor. **Department of Plant Pathology**, Auburn University. Auburn, AL 36849 - USA. 1999

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.

KOMBRINK, E. & SCHMELZER, E. The hypersensitive response and role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 69-78, 2001.

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

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

KUC, J. Non pesticide control of plant disease by immunization. In: Lyr, H. & Potter, c. (ed). Proceeding of the 10th International Symposium on Systemic Fungicides and Antifungal Compounds. **Ullmer Publication**, Stuttgart, p.225-237, 1993.

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

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application, **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7-12, 2001.

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.

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

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

LORITO, M.; HARMAN, E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; Di PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, p.302-306, 1993.

LORITO, M.; WOO, S.; FRENANDEZ, I. G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G. E.; PINTOR-TOROS, J.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C. B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.7860-7865, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; BANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Research**, v. 528, p. 75-79, 2003.

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

MALAMY, J., J. P. Carr, D. F. Klessig, and I. Raskin. 1990. Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science** 250:1002-1004.

MANANDHAR, H. K.; MATHUR, S. B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Accumulation of transcripts for pathogenesis-related proteins and peroxidases in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and *U.v. light*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, New York, v. 55, p. 289-295, 1999.

MATSUI, T. O.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 133-144, 2003.

MAUCH, F., L. A. Hadwiger, and T. Boller. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and b-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. **Plant Physiol.**76:607-611,1984.

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. pág. 15-19, 2005.

MÉTRAUX, J.-P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W. & INVERARDI, B. **Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber**. *Science* 250:1004-6. 1990.

MÉTRAUX, J.-P. Professor. Department of Biology, University of Fribourg. Rte A. Gockel 3 - 1700 Fribourg, Switzerland , 1999.

MÉTRAUX, 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. 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.

MOLINA, A.; HUNT, D. M.; RYALS, J. A. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. **The Plant Cell**, v. 10, n.11, p. 1903-1914,1998.

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

MORAN, P. J.; CIPOLLINI, D. F. Effect of wind-induced mechanical stress on soluble peroxidase activity and resistance to pest in cucumber. **Journal of Phytopathology**, v. 147, p.313-316, 1999.

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*. **Fitopatol. Bras.**, Brasilia, v.13, p. 211-223, 1988.

NILSEN, K. N.; HODGES, C. F.; MADSEN, J. P. Pathogenesis of *Drechslera sorokiniana* leaf spot on progressively older leaves of *Poa pratensis* as influenced by photoperiod and light quality. **Physiological Plant Pathology**. New York, v. 15, p. 171-176, 1979.

OKU, H. Host-parasite relation in Helminthosporium leaf spot disease of rice plant from the viewpoint of biochemical nature of the pathogen. In: Z. Kiraly, G. Ubrizsy (Eds). **Host-parasite relations in plant pathology**, New York, p. 183-191, 1964.

OKU, H. **Plant pathogenesis and disease control**. London, CRC Press, 1994.

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.

ÓPERA. Padrão de controle. **Catálogo Basf**, 2005 ou www.basf.com.br

PASCHOLATTI, S.F e LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **RAPP**, , v.2, p. 1-50, 1994.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 .ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.1, cap. 22,p.417-453 , 1995.

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, 507-514, 1986.

PEREIRA, A.B. **Introdução ao estudo dos Agaricales**. *Acta Leopoldensia*, 6(2):159-82. 1984.

PICININI, E. C. O controle de uma doença em potencial. **Correio Agrícola**, São Paulo, n.1, p.7-9, 1990.

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.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A. & VAN LOON, L.C. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **Plant Cell** 8:1225-37, 1996.

PIETERSE, C. M. J., Van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P. J. & Van Loon, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10: 1571-1580, 1998

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.-P. & VAN LOON, L.C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is

not accompanied by an increase in their production. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 57:123-34, 2000.

PUTZKE, J. Lista dos fungos *Agaricales* (*Hymenomyces*, *Basidiomycotina*) referidos para Brasil. **Caderno de Pesquisa, Série Botânica** 6: 1-189, 1994.

RASKIN, I. Role of salicylic in plants. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, USA, 43: 439-463, 1992.

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

REIS, E. M. Selective médium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. **Plant Disease**, v. 67, p. 68-70, 1983.

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

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, 2002, p. 519-530. 2002.

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

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p. 1809-19. 1996.

RYALS, J.; WEYMANN, K.; LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; ELLIS, D.; STEINER, H.Y.; JOHNSON, J.; DELANEY, T.P.; JESSE, T.; VOS, P. & UKNES, S. The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. **Plant Cell** 9: 425-39, 1997.

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISSENER, H. J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 293-307, 1995.

SCHWEIZER, P.; KMECL, A.; CARPITA, N.; DUDLER, R. A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is recognized by a broad range of cereals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, n.4, p.157-167, 2000.

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. **Ann. London**, v. 37, p. 51-79, 1983.

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

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

SINGER R. Cyanophilous spore walls in the agaricales and agaricoid Basidiomycetes. **Mycologia**, 64(4):822-829, 1972.

SLOVÁKOVÁ, L.; LISKOVA, D.; CAPEK, P.; KUBACKOVÁ, M.; KÁKONIOVÁ, D.; KARACSONYI, S. Defense responses against TNV infection induced by galactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 543-553, 2000.

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

STAMETS, P. **Mycomedicinals**: an informational booklet on medicinal mushrooms. Cross-Index of Mushrooms and Targeted Disease Complexes, 1997. p. 4.

STEGEMANN, H. & BURGERMEISTER, W. Gel-elektrophorese und isoelektrische fokussierung. **BBA**. Braunschweig, 1987.

STEIN, B. D.; KLOMPARENNS, K.; HAMMERSCHMIDT, R. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of Phytopatology**, v.137, p. 177-188, 1993.

STICHER, L., B. Mauch Mani, and J. P. Metraux. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** 35:235-270, 1997.

STUMPF, P. K. , and E. E. (Ed) Conn. The Biochemistry of Plants - **Secondary Plant Products**. New York: Academic Press, 1981.

SUBRAMANIAM, R.; DESVEAUX, D.; SPICKLER, C.; MICHNICK, S.W. & BRISSON, N. Direct visualization of protein interactions in plant cells. **Nat. Biotechnol.** 19:769-72, 2001.

SVALHEIM, O.; ROBERTSEN, B. Elicitation of H₂O₂ in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4-a-D-galacturonides and an oligo-b-glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 675-681, 1993.

SWAIN, R. & HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. L. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 10, p. 63-68, 1959.

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 HOOFF, A.; LEYMAM, J.; SCHEFER, H. J.; WALTON, J. D. A single beta-1,3-glucanase secreted by the maize pathogen *C. carbonum* acts by an exolytic mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, p. 259-267, 1991.

VAN LOON, L. C. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. **Neth. J. Plant Pathol.**, 89: 265-273, 1983

VAN LOON, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36: 453-483, 1998

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN 'T WESTENDE, Y.A.M.; HARTOG, F. & VAN LOON, L.C. **Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria.** Mol. Plant-Microbe Interact. 10:716-24, 1997.

WALTON, J. D. Biochemical plant pathology. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant biochemistry.** London: Academic Press, cap.13, p.487-502, 1997.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.-P. & RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell** 3: 1085-94, 1991.

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

WOBETO, C. **Avaliação de safra na cooperativa agrária em 2004.** Anais e Ata da XXV Reunião Anual de Pesquisa de cevada. EMBRAPA, Guarapuava, 12-13 de abril de 2005. pág. 47-49, 2005.

WURMS, K.; LABBÉ, C.; BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Effects of Milsana and Benzothiadizole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. **Phytopathology**, v.89, n.9, p. 728-736, 1999.

ZHANG, Y.; FAN, W.; KINKEMA, M.; LI, X. & DONG, X. **Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6523-8, 1999.

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](#)