

CLÁUDIA CRISTINA LEITE FIORI SUZUKI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora
edulis* f. *flavicarpa*) POR SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E COGUMELO DO
SOL (*Agaricus blazei*)**

Maringá – Paraná - Brasil

Fev - 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CLÁUDIA CRISTINA LEITE FIORI SUZUKI

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) POR SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E COGUMELO DO SOL (*Agaricus blazei*)

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como requisito do curso de Pós-Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Doutor na área de concentração de Proteção de Plantas.

Maringá – Paraná - Brasil

Fev - 2008

À Vida em sua plenitude, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, Grande Força, Vida, Deus, pela oportunidade.

À minha filha amada, Amanda, que por ela tive e tenho vontade e força para lutar, pois é a minha inspiração de vida.

À minha tia Heleninha, um verdadeiro anjo da guarda em minha vida, que com todo desprendimento e amor, deu todo e qualquer apoio que precisei, mesmo quando não pedi.

À minha família maravilhosa que me incentivou sempre.

À querida, prof^a Dra. Kátia R. F. S. Estrada, pela orientação, apoio e a valiosíssima amizade desenvolvida durante esta jornada e que desejo que perdure por toda nossa existência.

À querida amiga, Solange Maria Bonaldo, pela maravilhosa amizade, companheirismo e disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

Aos co-orientadores, prof. Dr. José Renato Stangarlin e prof. Dr. José Ozinaldo Alves de Sena.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Ao professor Bonato (Fisiologia), Ismar (Anatomia) e Cristina (Bioquímica), pelas sugestões e ajuda.

Ao Odair, pelas valiosas sugestões e conselhos durante os trabalhos experimentais.

Aos queridos amigos do laboratório, que além de amigos, contribuíram tecnicamente, Renata, Danila, Rafael, Adriana, João Tolentino, Maria, Marinelva.

Ao querido amigo, Rafael Caldas, que tanto ajudou com seus conselhos, sugestões e trabalho.

Aos técnicos do laboratório J57, Mauro e Júnior pela valiosa ajuda e amizade durante esses quatro anos de curso.

Ao Milton e ao Luís que me ajudaram durante um ano inteiro no experimento da casa de vegetação.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que não foram citadas nominalmente, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço.

BIOGRAFIA

Cláudia Cristina Leite Fiori Suzuki, filha de Maria Célia Barboza Leite Fiori e Waldomiro Fiori, nasceu em Astorga, Estado do Paraná, aos seis dias do mês de setembro de 1966.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) em 1989.

Em março de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), concluindo-o em fevereiro de 2003.

Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, pela Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. CULTURA DO MARACUJAZEIRO	3
2.2. BACTERIOSE DO MARACUJAZEIRO	5
2.2.1. Etiologia	5
2.2.2. Epidemiologia	6
2.2.3. Sintomatologia	7
2.2.4. Controle	9
2.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	9
2.3.1. Indutores de resistência	10
2.3.2. Mecanismos Envolvidos Na Indução De Resistência	12
2.3.2.1. Lignificação	14
2.3.2.2. Enzimas Envolvidas na Indução de Resistência	16
2.3.2.2.1. Peroxidases (E.C. 1.11.1.7)	16
2.3.2.2.2. Glucanases (E.C 3.2.1.39) e Quitinases (EC 3.2.1.14)	17
2.4. Cogumelos <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinula edodes</i>	19
2.4.1. <i>Agaricus blazei</i>	19
2.4.2. <i>Lentinula edodes</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Obtenção dos isolados e dos extratos aquosos de <i>Lentinula edodes</i> e <i>Agaricus blazei</i>	25
3.2. Obtenção do fitopatógeno <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> ...	25
3.3. Efeito <i>in vitro</i> dos cogumelos sobre <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	26
3.4. Indução de resistência em plantas de maracujazeiro por extratos aquosos dos cogumelos	26
3.4.1. Obtenção dos extratos protéicos	27

3.4.2. Determinação da atividade de peroxidases	28
3.4.3. Determinação da atividade de β -1,3-glucanase	28
3.4.4. Determinação da atividade de quitinases	29
3.4.5. Quantificação de proteínas	29
3.5. Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em plântulas de maracujazeiro, por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	30
3.6. Efeito dos extratos de cogumelos na emergência de plântulas de maracujazeiro	31
3.7. Proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, por extratos aquosos de cogumelos aplicados por meio de tratamento de sementes e pulverização foliar	31
3.7.1. Aplicação dos cogumelos por tratamento de sementes	32
3.7.2. Aplicação dos cogumelos através de pulverização foliar	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Efeito <i>in vitro</i> dos cogumelos sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	34
4.2. Indução de resistência em plantas de maracujazeiro por extratos aquosos dos cogumelos	38
4.3. Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em plântulas de maracujazeiro, por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	49
4.4. Efeito dos extratos de cogumelos na emergência de plântulas de maracujazeiro	52
4.5. Proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, por extratos aquosos de cogumelos aplicados através de tratamento de sementes e pulverização foliar	56
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXOS	82

RESUMO

FIORI-SUZUKI, CLÁUDIA CRISTINA LEITE, D.S., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2008. **Indução de resistência em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por shiitake (*Lentinula edodes*) e cogumelo do sol (*Agaricus blazei*)**. Professora Orientadora: Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada. Professores co-orientadores: Dr. José Renato Stangarlin e Dr. José Ozinaldo Alves de Sena.

Atualmente, é grande a preocupação em relação ao uso excessivo de agrotóxicos na agricultura e seus efeitos sobre o meio ambiente e à saúde humana. Em função disso, novas tecnologias estão sendo testadas como o controle alternativo onde se inclui a indução de resistência. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito *in vitro* dos cogumelos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; avaliar a proteção de plantas de maracujazeiro por extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*; detectar, por PCR, a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em plântulas de maracujazeiro; avaliar o efeito dos extratos dos cogumelos na emergência de plântulas de maracujazeiro; e avaliar a proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, por extratos aquosos dos cogumelos aplicados por meio de tratamento de sementes e pulverização foliar. Nos testes *in vitro*, os extratos aquosos de *L. edodes* exerceram inibição dose dependente sobre a bactéria, aumentando a inibição com o aumento da concentração dos extratos. Para os extratos de *A. blazei*, houve efeito estimulatório da bactéria até a concentração de 20% e a partir disso o efeito foi inibitório. Os resultados das análises enzimáticas mostraram que o extrato de *A. blazei* 20% foi eficiente em aumentar a atividade de peroxidases nas cultivares IAC-275 e Epagri, e quitinases na cultivar IAC, quando o cultivo foi em solo de barranco. O extrato de *L. edodes* 40% provocou aumento da atividade de peroxidases na cultivar Epagri e da atividade de β -1,3-glucanase na cultivar IAC-275. Também para a cultivar IAC-275, o extrato de *L. edodes* 20% proporcionou aumento da atividade de β -1,3-glucanase. Utilizando a técnica de PCR, observou-se a presença de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em todos os lotes testados. Os cogumelos não interferiram negativamente na emergência das plântulas de

maracujazeiro. Na avaliação de proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, observou-se que houve uma diminuição da severidade da bacteriose em plantas que foram tratadas com *L. edodes* e *A. blazei* tanto nas sementes, quanto em pulverizações foliares. Com base nos resultados, os cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* apresentam potencial para auxiliar no controle da bacteriose do maracujazeiro.

ABSTRACT

FIORI-SUZUKI, CLÁUDIA CRISTINA LEITE, D.S., Universidade Estadual de Maringá, February, 2008. **Resistance induction in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by shiitake (*Lentinula edodes*) and sun mushroom (*Agaricus blazei*).** Adviser: Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada. Committee Members: Dr. José Renato Stangarlin and Dr. José Ozinaldo Alves de Sena.

Currently, the concern about the overuse of agrochemical in the agriculture and its effects upon the environment and human health is huge. Due to this situation, new technologies are being tested as the alternative control where is included the resistance induction. In face of that, this paper aimed for an evaluation of the effect *in vitro* of the mushrooms on *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; for an evaluation of the passion fruit plant protection by aqueous extracts from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei*; for a detection, by PCR, of the bacteria *X. axonopodis* pv. *Passiflorae* in passion fruit seedlings; an evaluation of the effect of the mushrooms extracts on the emergence of passion fruit seedlings; and evaluation of the passion fruit plant protection, in greenhouses, by aqueous extracts of the mushrooms applied by seed treatment and foliar spraying. In the *in vitro* tests, the aqueous extracts of *L. edodes* performed dose-dependent inhibition in the bacteria, increasing the inhibition with the increase of the extracts concentration. To the *A. blazei* extracts, there was a stimulating effect of the bacteria up to the concentration of 20% and then the effect was inhibited. The enzymatic analyses results showed that the *A. blazei* 20% extract was efficient at increasing the peroxidase activity in cultivars IAC-275 and Epagri, and chitinases in cultivar IAC, when cultivated in bank soil. The *L. edodes* 40% extract caused an increase in the peroxidase activity in Epagri cultivar and in the activity of β -1,3-glucanase in cultivar IAC-275. In the cultivar IAC-275, *L. edodes* 20% extract also caused an increase in the activity of β -1,3-glucanase. It was possible, by using the PCR technique, to observe the presence of *X. axonopodis* pv. *passiflorae* in all batches tested. The mushrooms did not interfere negatively in the emergence of

the passion fruit seedling. In the evaluation of passion fruit plant protection, in greenhouse, there was a decrease in the bacterial spot severity in plants that were treated with *L. edodes* and *A. blazei*, in seeds as in foliar spraying. The results demonstrated that the mushrooms *L. edodes* and *A. blazei* have potential to help control the bacterial spot in the passion fruit.

1. INTRODUÇÃO

A cultura comercial do maracujazeiro no Brasil iniciou-se na década de 70 e hoje o país é o maior produtor mundial de maracujá amarelo. As perspectivas de mercado, tanto para o segmento indústria ou mesa, são promissoras por se tratar de uma cultura com demanda crescente de fruta fresca, industrialização de sucos concentrados, sucos prontos para beber e polpas. É de grande relevância o caráter social da cultura de maracujá, por ser ela uma fruteira cultivada predominantemente em pequenos pomares, constituindo assim, uma alternativa de produção e de elevação de renda para pequenos e médios produtores.

Porém, problemas fitossanitários têm contribuído para a redução da vida útil dos novos plantios. Um dos principais problemas tem sido a bacteriose do maracujazeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, que provoca danos severos às plantas e à produtividade da cultura, além de diminuir a vida útil dos pomares.

Na região de Maringá, a Prefeitura Municipal incentivou o cultivo do maracujazeiro, adquirindo e repassando mudas a pequenos agricultores. Porém, os pomares acabaram por serem erradicados por causa da bacteriose. O resultado foi prejuízo e desestímulo. A tecnologia tradicionalmente adotada por esses fruticultores utiliza, intensivamente, fungicidas para o controle de doenças (MOTTA, 2005).

Entretanto, com o aumento expressivo do uso de agrotóxicos, as perdas atribuídas a doenças e pragas não sofreram redução drástica e os ganhos de produtividade não têm sido significativos. Os fungicidas sintéticos podem permanecer no sistema e se acumular na cadeia alimentar, prejudicando em última análise, todos os seres vivos. Além do que, o problema reside no fato de que tais patógenos têm se tornando resistentes à maioria dos fungicidas, os quais estão sendo utilizados sem um critério rigoroso. Aliado a esse fato, as preocupações com o ambiente e com a saúde humana têm contribuído para modificar esta situação por meio do uso de métodos alternativos. Um dos

enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças que inclui a indução de resistência em plantas. A indução de resistência baseia-se no potencial genético da planta em ativar mecanismos eficientes de defesa quando tratada com um agente indutor.

Tendo em vista que a ativação de mecanismos de resistência em plantas tem demonstrado um potencial promissor, este trabalho teve como objetivos: avaliar o efeito *in vitro* dos extratos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; avaliar a indução de resistência em plantas de maracujazeiro, detectar a bactéria, por PCR, em plântulas de maracujazeiro; avaliar o efeito dos extratos dos cogumelos na emergência e proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CULTURA DO MARACUJAZEIRO

O termo maracujá refere-se a frutos de plantas originárias da América Tropical. Seu nome é derivado do vocábulo tupi “mara cuia”, que significa comida preparada em cuia (CUNHA & BARBOSA, 2002). Outra denominação foi relatada por Jacomo Bosio em 1610, como “flor da paixão”, de origem mística, dada à semelhança da flor com os símbolos da Paixão de Cristo. A flor mostra os filamentos da coroa como a coroa de espinhos, os estigmas como os cravos, o androginóforo como a coluna de flagelação e os estames representam as cinco feridas feitas em Jesus Cristo (CUNHA & BARBOSA, 2002).

O maracujazeiro é cultivado, principalmente, pelas características alimentícias de seus frutos, sendo importante fonte de sais minerais e vitaminas, sobretudo as vitaminas A e C (LIMA, 2002). Também é cultivado pelo seu valor medicinal devido às propriedades calmantes da passiflorina, um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (SOUSA & MELETTI, 1997).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, sub-lenhosa, de crescimento vigoroso contínuo, podendo atingir de 5 a 10m de comprimento, com sistema radicular pouco profundo, apresentando raízes até 30cm de profundidade (FERRARI, 2006), embora, a maioria das raízes encontra-se nos primeiros 15 cm (CUNHA & BARBOSA, 2002). As folhas são lobadas ou digitadas com gavinhas, gema florífera e gema vegetativa na axila da folha. A flor é andrógina com estigmas localizados acima das anteras (FERRARI, 2006). O fruto do maracujazeiro tem a forma ovóide ou globosa, raramente fusiforme, com polpa mucilagínosa. A casca é coriácea, quebradiça ou lisa, protegendo o mesocarpo, no interior do qual estão as sementes (CUNHA & BARBOSA, 2002).

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, cujo gênero *Passiflora* destaca-se com três espécies de importância econômica: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo ou azedo), *Passiflora edulis* Sims (maracujá

roxo) e *Passiflora alata* Ait (maracujá doce), que são as espécies que possuem maior expressão comercial, tanto para o uso *in natura* como para a produção de suco concentrado. Existem cerca de 530 variedades tropicais e subtropicais sendo 150 nativas do Brasil e 60 delas possuem frutos que podem ser aproveitados na alimentação (FERRARI, 2006).

A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* que é conhecida vulgarmente por maracujá-amarelo ou maracujá azedo, é uma planta nativa da América do Sul, embora existam divergências quanto à sua origem, sendo, provavelmente, o Brasil o seu centro de origem (CUNHA; BARBOSA; JUNQUEIRA, 2002). Possui folhas simples, trilobadas, exceto quando jovens, quando as folhas apresentam-se inteiras. O fruto é ovóide ou globoso (SOUSA & MELETTI, 1997) com diâmetro longitudinal de 5,1 a 9,1cm e peso de 39 a 105g (MANICA, 1997). De maneira geral, o maracujá-amarelo se assemelha a *P. edulis*, diferindo desse táxon pela presença de duas glândulas marginais nas sépalas mais externas, coroa fortemente roxa na base, frutos maiores (6-12cm de comprimento), e, principalmente pela pigmentação amarela da casca do fruto na maturação (CARVALHO-OKANO & VIEIRA, 2001; CUNHA & BARBOSA, 2002).

No Brasil, o cultivo de maracujá teve início na década de 70, época em que o país não constava entre os maiores produtores mundiais e a comercialização do fruto baseava-se somente no comércio *in natura* (RUGGIERO et al., 1996). A partir de 1986, observou-se uma ampliação significativa na área cultivada e produção acompanhada pelo aumento do consumo, pois as indústrias extratoras de suco estimularam o mercado do produto industrializado. A década de 90 do século passado foi marcada pela valorização do preço da fruta fresca (MELETTI & MAIA, 1999).

Com aproximadamente 35 mil hectares de área cultivada e produção superior a 317 mil toneladas por ano, o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá amarelo. Apesar da posição de destaque do Brasil na produção de maracujá, a produtividade média nacional é de 14t/ha, considerada baixa ao ser comparada com a produtividade média do Havaí que é de 50t/ha (FALEIRO, 2006).

A cultura encontra-se em plena expansão no Brasil, com um crescimento médio de 5% ao ano. O cultivo do maracujazeiro está difundido em quase todo o país, destacando-se como principais estados produtores o Pará, Bahia, São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Ceará e Minas Gerais, que são responsáveis por 97% da produção nacional (AGUIAR & SANTOS, 2001).

A produção brasileira é destinada, principalmente, ao consumo *in natura* e fabricação de suco que, além de ser consumido no mercado interno, é exportado. Para os exportadores brasileiros, o principal mercado ainda é o europeu que adquire mais de 90% do suco para exportação. No entanto, há boas perspectivas para os mercados norte-americano, canadense e japonês (SOUZA et al., 2002).

2.2. BACTERIOSE DO MARACUJAZEIRO

As doenças causadas por fitobactérias são muito relevantes, pois podem inviabilizar a exploração econômica de determinadas culturas (ROMEIRO, 1995).

Atualmente, no Brasil, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves & Rosato é a única a causar bacteriose de importância econômica para a cultura do maracujazeiro. Foi constatada pela primeira vez no Estado de São Paulo, na região Araraquarense, em 1967, infectando plantas em cultivos comerciais (BERIAM & MALAVOLTA JÚNIOR, 2006). Essa bactéria apresenta ampla distribuição no território nacional, tendo sido observada nos principais Estados onde o maracujazeiro é plantado comercialmente. Em condições naturais, ocorrem em maracujá-amarelo, maracujá-roxo e maracujá-doce e, aliada a outros patógenos, provoca uma anomalia denominada “morte-precoce” do maracujazeiro, que diminui drasticamente o período de exploração comercial e de vida das plantas afetadas (TODA FRUTA, 2002).

2.2.1. Etiologia

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* tem a forma de bastonete, é gram-negativa, móvel por um flagelo polar, não produz esporos ou

cápsulas e mede 0,5 x 1,5mm. Possui colônias em nuances amarelo-brilhantes, circulares, convexas e mucóides, tendo crescimento ótimo a 27°C. Produz amônia, liquefaz gelatina e hidrolisa fortemente amido. Não utiliza asparagina como fonte de carbono e nitrogênio, utiliza citrato, galactose, frutose, manose e trealose. Não reduz nitrato nem produz indol. Apresenta variabilidade quanto à produção de H₂S (PIO-RIBEIRO & MARIANO 1997). Nakatani (2001) identificou grande variabilidade genética entre os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* por meio de marcadores moleculares RAPD, encontrando, posteriormente, variação de patogenicidade em população de maracujá amarelo testada com os cinco isolados que apresentaram maior divergência genética entre si.

Caracteristicamente, produz um pigmento amarelo e insolúvel, denominado xantomonadina que pode estar associado à patogenicidade. Todas as espécies do gênero são fitopatogênicas, mostrando especialização em termos evolutivos (ROMEIRO, 1995).

Além do maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis*) e do maracujazeiro doce (*Passiflora alata*), recentemente foi descrita a ocorrência da bactéria em duas outras espécies: *P. amethystina* e *P. serrato digitata* (BERIAM & MALAVOLTA JÚNIOR, 2006).

2.2.2. Epidemiologia

O primeiro ponto a ser considerado é a transmissão da bactéria pela semente (inóculo primário). Plântulas infectadas expressam sintomas da bacteriose quando há condições de alta umidade e temperaturas elevadas. Nestes casos, dificilmente a cultura sobrevive ao primeiro ano após o plantio. A bactéria pode sobreviver por vários meses em restos culturais. Quando ocorre de forma sistêmica, as práticas culturais como poda, polinização, desbaste, capinas e as próprias pulverizações com fungicidas, herbicidas, adubos foliares, entre outras, têm papel importante na disseminação da bactéria. Nos períodos chuvosos com temperaturas elevadas, o patógeno dissemina-se de forma rápida e violenta comprometendo toda a cultura em pouco tempo. Durante o inverno, juntamente

com períodos de estiagem, a disseminação da bactéria no campo, quando ocorre, é lenta (BERIAM & MALAVOLTA JÚNIOR, 2006). *X. axonopodis* pv. *passiflorae* sobrevive, principalmente, em restos culturais, sendo o período de sobrevivência diminuído com o seu enterrio (LIBERATO & COSTA, 2001).

2.2.3. Sintomatologia

Os sintomas ocorrem principalmente nas partes tenras dos tecidos e elementos vasculares adjacentes. A doença pode apresentar duas formas de infecção: a localizada e a sistêmica. A forma localizada acontece nas folhas, principalmente nas mais internas e a forma sistêmica ocorre junto às nervuras foliares (SANTOS FILHO; SANTOS; CORDEIRO, 2002).

Nas folhas, ocorrem lesões pequenas, encharcadas, oleosas, translúcidas, e com halos visíveis. Com a evolução da doença, as lesões tornam-se marrons, deprimidas, com formato variado, mas raramente circulares, que coalescem, sendo mais evidentes na face dorsal. A partir destas lesões foliares, a infecção pode se tornar sistêmica e atingir os ramos, que podem apresentar caneluras longitudinais, então se segue a desfolha, seca a partir das extremidades e redução na frutificação. A exsudação típica de pus bacteriano pode ser vista quando feixes vasculares infectados são comprimidos (PIO-RIBEIRO & MARIANO, 1997; EL TASSA & DUARTE, 2002).

Nos últimos anos, têm-se observado em diversas regiões produtoras do Estado de São Paulo, algumas mudanças na sintomatologia apresentada pelas plantas infectadas, com predominância da forma sistêmica de infecção em relação à forma localizada. A forma sistêmica caracteriza-se por um crestamento foliar intenso, podendo originar-se tanto a partir de uma lesão angular (forma localizada de infecção), quanto pela penetração da bactéria em ferimentos ou aberturas naturais, como os estômatos ou hidatódios. O crestamento pode atingir grandes áreas foliares, tornando as áreas doentes pardacentas, translúcidas contra a luz e escurecimento de pequenas porções das nervuras. As folhas desprendem-se facilmente dos ramos, cujo resultado é uma intensa desfolha. A característica

predominante na forma localizada constitui-se de lesões nitidamente angulares (TODA FRUTA, 2002).

Recentemente, constatou-se infecção em flores de *P. alata*, tanto nas sépalas quanto nas pétalas, apresentando manchas irregulares de aspecto translúcido e oleoso. Estudos em desenvolvimento sugerem a ação de uma toxina produzida pela bactéria como responsável pela indução desse tipo de sintoma (BERIAM & MALAVOLTA JÚNIOR, 2006).

Malavolta Junior; Beriam; Rodrigues Neto (2001) relataram a presença de bacteriose ocasionada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em frutos de maracujazeiro-doce (*P. alata*), em plantio comercial localizado no município de Valinhos, Estado de São Paulo. Em novembro de 1998, foram coletados e analisados os frutos que, na maioria das vezes, estavam íntegros externamente, sem manchas ou perfurações. Entretanto, apresentavam partes flácidas e caíam antes de atingir o ponto de maturação. Cortes realizados nesses frutos, tanto transversalmente como longitudinalmente, mostravam que estava ocorrendo deterioração do mesocarpo caracterizada por podridão mole com anasarca, descoloração, separação da casca e aparecimento, ou não, de cavidades.

De maneira geral, em frutos infectados desenvolvem-se manchas pardas quando há condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, depreciando o aspecto do produto e, em raros casos, causa seu apodrecimento (MALAVOLTA JUNIOR; BERIAM, RODRIGUES NETO, 2001).

A disseminação planta-a-planta é favorecida por respingos de água, principalmente associados a ventos fortes. Por ser transmitida por sementes contaminadas, a introdução do patógeno em novas áreas de cultivo ocorre facilmente, observando-se regularmente em viveiros, mudas expressando sintomas típicos. Mesmo assim, os produtores costumam utilizar mudas sintomáticas para plantio no campo, até mesmo para reposição de plantas doentes (HALFELD-VIERA & NECHET, 2006).

2.2.4. Controle

A principal medida de controle da mancha bacteriana é a exclusão, evitando-se assim, a introdução do patógeno na área de cultivo por meio da utilização de sementes e mudas sadias (HALFELD-VIERA & NECHET, 2006).

Segundo Beriam & Malavolta Junior (2006), uma ótima alternativa de controle seria a procura de variedades resistentes ou que apresentassem certo grau de tolerância à *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

O tratamento de sementes com produtos bactericidas visando a eliminação do patógeno tem sido realizado, existindo vários produtos eficientes para esse fim, como a terramicina e o oxicloreto de cobre (BERIAM & MALAVOLTA JUNIOR, 2006). Existem produtos cúpricos e antibióticos registrados para o controle da mancha bacteriana que são formulados com sulfato de cobre + oxitetraciclina; oxitetraciclina + sulfato de estreptomicina e kasugamicina (MAPA, 2006). Fungicidas à base de cobre são uma opção no controle da mancha bacteriana, no entanto, estudos indicam que podem ser encontrados isolados resistentes a fungicidas cúpricos (FRANCO & TAKATSU, 2004).

2.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Apesar da aparente passividade associada ao caráter sedentário, as plantas percebem as agressões e não aceitam de modo passivo esses ataques que sofrem de vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou de agentes não-biológicos como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros (MARGIS-PINHEIRO et al. 1999). No transcorrer do processo evolutivo, principalmente pela seleção natural e por mutações, as plantas superiores desenvolveram vários mecanismos que, por meio de rotas metabólicas específicas, lhes permitem sintetizar, acumular e secretar uma grande variedade de metabólitos secundários utilizados na formação de barreiras de natureza física e/ou química, cujas principais funções parecem ser de proteção e/ou autodefesa (RESENDE & CARVALHO, 2002). Sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam

com freqüência, mesmo tendo, muitas vezes, seus desenvolvimentos prejudicados. Os efeitos são mais graves sobre as espécies de interesse agrícola que são muito vulneráveis, pois, em geral, são usadas em monoculturas geneticamente uniformes. Quando uma doença atinge essas espécies, as perdas podem ser severas (MARGIS-PINHEIRO et al. 1999).

A indução de resistência surgiu como uma possível alternativa, ou complementação estratégica para as culturas vegetais, significando o controle de pragas e patógenos por prévia ativação de precursores, geneticamente programados de defesa vegetal (KOGEL & LANGEN, 2005).

O termo “indução de resistência” pode ser utilizado na designação de proteção local, ou seja, ocorre a proteção somente onde foi efetuado o tratamento com o agente indutor, ou também, pode indicar uma resistência sistêmica com a proteção manifestada distante do local onde foi feito o tratamento com o agente indutor (MORAES, 1992). No “First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases”, realizado em Corfu, na Grécia, em 2000, foi proposto que o termo “resistência induzida” seja utilizado para designar todos os tipos de respostas eliciadas que levam a proteção contra doenças, incluindo respostas locais e sistêmicas (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001).

2.3.1. Indutores de resistência

Vários compostos inorgânicos ou orgânicos, não relacionados estruturalmente, induziram a resistência em plantas ao ataque por insetos herbívoros e doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematóides (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). Essas substâncias foram denominadas de agentes indutores devido a sua capacidade de induzir a resistência contra doenças nas plantas tratadas com eles (GUZZO, 2004). A ativação de mecanismos de defesa pela planta pode ser obtida pelo tratamento com agentes de indução que podem ser de natureza biótica (por exemplo, microorganismos viáveis ou inativados) ou natureza abiótica (por exemplo, ácidos

graxos, ácido salicílico, quitosana, metil jasmonato e derivados do ácido 2,6-dicloro-nicotínico) (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Os agentes indutores possuem elicitores. Elicitores são quaisquer moléculas ou fatores que estimulam qualquer resposta de defesa nas plantas, sendo classificados em bióticos e abióticos (SMITH, 1996). Entretanto, várias moléculas de origem biológica já estão sendo sintetizadas em laboratório (RESENDE, 2003). As moléculas elicitoras bióticas são de natureza variável, sendo mais comum à ocorrência de carboidratos, lipídios, proteínas e glicoproteínas. A origem dessas substâncias também pode ser variável, por exemplo, lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos e leveduras, e carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos, são alguns dos elicitores capazes de ativar mecanismos de defesa de plantas (COVENTRY & DUBERY, 2001; WULFF & PASCHOLATI, 1999). A variação da natureza química dos elicitores demonstra que não há uma característica estrutural única que possa ser considerada como determinante da atividade elicitora (SMITH, 1996).

A ativação de defesa de plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas (STANGARLIN et al., 1999). Segundo Schwan-Estrada (2003), várias plantas têm sido utilizadas em bioensaios para a indução de fitoalexinas em sorgo (deoxiantocianidinas) (MOREIRA, 2003; FRANZENER et al., 2007) e soja (gliceolina); na indução de resistência em pepino a *Colletotrichum lagenarium* (BONALDO, et al. 2004); no tratamento de sementes de trigo para o controle de *Bipolaris sorokiniana* (RODRIGUES, 2001); em plantas de trigo para o controle do mesmo patógeno (FRANZENER et al., 2003); indução de resistência em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana* (CARVALHO & BACH, 2004); indução de resistência em tomateiro contra *Alternaria solani* (BALBI-PEÑA et al., 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, possui agentes elicitores em sua parede celular e vários trabalhos mostram seu potencial em controlar doenças por meio de indução de resistência (PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005; BONALDO, 2005). A aspersão prévia de *S. cerevisiae* em plântulas de milho

pipoca suscetíveis a *Exserohilum turcicum* reduziu o tamanho e o número médio de lesões por planta. (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994). *S. cerevisiae* possui moléculas elicitoras capazes de induzir o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (WULFF & PASCHOLATI, 1999).

Segundo Pascholati & Leite (1994), luz ultravioleta, moléculas orgânicas sintetizadas em laboratório e íons metálicos podem ser classificados como elicitores abióticos. O silício tem sido apresentado como um dos elementos associados à indução da resistência em plantas (SAVANT et al., 1999), na cultura de arroz foi relatado para o fungo *Pyricularia grisea* (NOJOSA, 2003) e *Rhizoctonia solani* (RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006), para a cultura de café ocorreu a diminuição da incidência e severidade de cercosporiose nas mudas (SANTOS, 2002). Em plantas de pepino, os silicatos também são importantes para o controle de *Pythium ultimum* e *Sphaerotheca fulginea*, sendo que para este, também foi descrita a diminuição significativa do número de colônias do fungo por planta e por folha, quando estas foram tratadas com fosfatos (NOJOSA, 2003). Em mamoeiro, o silício reduziu a incidência e severidade da varíola causada por *Asperisporium caricae* (PRATRISSEOLI, et al, 2007).

Atualmente, novos produtos estão surgindo baseados em tecnologias peculiares que promovem a ativação de mecanismos de defesa das plantas. Produtos como Actigard® (Syngenta), Messenger® (Eden Bioscience), Oryzmate® (Bayer), Elexa® (SafeScience), Oxycom® (Redox Chemicals) e Phitogard® (Intrachem) (CAVALCANTI, 2003), porém, somente o Bion® – Acibenzolar-S-methyl (ASM), um análogo do ácido salicílico, é liberado comercialmente no Brasil desde o ano de 2001 (CASTRO, 2003; RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006).

2.3.2. Mecanismos envolvidos na indução de resistência

A resistência natural de plantas a microrganismos patogênicos baseia-se numa grande variedade de barreiras químicas e físicas que representam mecanismos de defesa eficientes que permanecem inativos ou latentes e que são

acionados ou ativados após a célula vegetal entrar em contato com agentes de indução (COLSON & DEVERAL, 1996). As plantas possuem fatores estruturais e bioquímicos pré-existentes (passivos, constitutivos) que estão envolvidos no processo de resistência antes da infecção pelo patógeno como cutícula, tricomas, fibras, vasos condutores, fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos. Após a infecção, pode aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro, como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça, tilose (PASCHOLATI & LEITE, 1995), podendo ocorrer também a explosão oxidativa (ALMEIDA, 2001).

Os diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para a resistência das plantas contra fitopatógenos são determinados geneticamente. A efetividade dos mecanismos é dependente da expressão em momento e magnitude adequados, numa seqüência lógica, que deve ocorrer após o contato do patógeno com o hospedeiro (PASCHOLATI, 1998). Tais mecanismos de defesa podem ser ativados próximo à área atacada pelo patógeno, numa tentativa de prevenir a colonização deste nos seus tecidos. A velocidade com que a planta reconhece a presença do agente elicitador determina o tempo de resposta à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa. Quando a resposta é mais rápida que o processo de infecção, a planta pode conter o desenvolvimento do patógeno, resultando, portanto, na expressão da resistência (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

A indução de resistência é controlada por um sistema multicomponente, sendo o resultado de um conjunto de eventos que ocorre de forma harmoniosa e que pode levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com a indução de resistência. Este fenômeno é caracterizado pela transformação de uma relação compatível entre planta e patógeno, em que ocorre a doença, numa relação incompatível e sem doença (SBALCHEIRO, 2006). A indução de resistência

apresenta a vantagem do patógeno ter dificuldade de evoluir para vencer os diferentes mecanismos de defesa, sendo, portanto, mais duradoura e estável que a resistência genética clássica (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005; KOGEL & LANGEN, 2005).

Didaticamente, os mecanismos de defesa dos vegetais são divididos em pré-formados e pós-formados. Os mecanismos pré-formados são aqueles presentes na planta antes do contato com o patógeno. Os mecanismos pós-formados encontram-se ausentes, ou presentes em níveis baixos antes da infecção, sendo produzidos em resposta à presença de patógenos (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

2.3.2.1. Lignificação

A lignina é um polímero tridimensional amorfo formado pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanóides, sendo iniciada pela deaminação da fenilalanina para ácido cinâmico e catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase. Outras enzimas na rota dos fenilpropanóides, como a álcool-cinamil-desidrogenase, a 4-cumarato e a peroxidase estão envolvidas em reações de resistência e lignificação. Vesículas armazenadoras de fenóis migram em direção à parede celular, onde ocorre a descompartimentalização dos fenóis das porções glicosídicas. Os fenóis livres sofrem oxidação, ligação à parede celular, ou são polimerizados, sendo que a ação do H_2O_2 catalisada por uma peroxidase sobre os alcoóis 4-coumaril, coniferil e sinapil, leva à geração de radicais livres e à formação de lignina (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

O fenômeno de lignificação é uma resposta ativa de plantas à invasão por patógenos e acumulam-se evidências de que se constitui em importante mecanismo de defesa, tendo sido observada em muitas espécies vegetais após a infecção com um organismo patogênico (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KÚC, 1982).

A contribuição da lignificação para a resistência pode ocorrer de diferentes formas. Em primeiro lugar, a incorporação de lignina junto à parede celular vegetal torna-a mais resistente à degradação por enzimas líticas secretadas pelo patógeno invasor. Ocorre aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos, impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI & LEITE, 1994). Os próprios precursores da lignina podem exercer um efeito tóxico sobre o patógeno ou conduzir à lignificação de estruturas do patógeno (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KÚC, 1982).

Segundo Koike et al. (2001), o aumento de deposição de lignina ocorreu em tecidos foliares de plântulas de pepino pré-tratados com filtrado da cultura de fungos promotores de crescimento de plantas (*Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp.) contra *Colletotrichum orbiculare*.

Embora a maior parte das pesquisas sobre a deposição de lignina como resposta de defesa seja conduzida com fungos, evidências indicam a possibilidade da lignina e/ou precursores da mesma contribuírem na resistência de plantas a bactérias. (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Segundo Hilaire, et al. (2001), o engrossamento da parede secundária do xilema devido à lignificação, diminui a extensão da membrana que é exposta às células bacterianas, reduzindo o acesso das células ao xilema parenquimático. Logo, paredes lignificadas no vaso do xilema podem funcionar como uma barreira à transferência de compostos produzidos pela bactéria para a célula vegetal, como fatores de virulência e avirulência. Em cana-de-açúcar, observou-se que variedades resistentes infectadas com a bactéria colonizadora de xilema, *Xanthomonas albilineans*, apresentaram uma significativa lignificação da parede celular quando comparadas às variedades não resistentes, indicando a lignificação como um meio de resistência (DABBAS et al., 2006).

2.3.2.2. Enzimas envolvidas na indução de resistência

2.3.2.2.1. Peroxidases (E.C. 1.11.1.7)

As peroxidases são glicoproteínas envolvidas na regulação de alongamento da célula vegetal, oxidação fenólica, ligação cruzada de polissacarídeos, oxidação de ácido indol-acético (AIA), ligações cruzadas de monômeros de extensina, cicatrização de feridas. O aumento dos níveis de peroxidases foram correlacionados com a resistência de muitas espécies vegetais a patógenos, incluindo cevada, algodão, fumo, trigo e arroz. Nestas interações, a enzima está envolvida na polimerização de proteínas e lignina ou suberina, que são componentes da parede celular vegetal. Talvez, as peroxidases sejam as únicas enzimas que polimerizam os álcoois em lignina (YOUNG et al., 1995). Além disso, os radicais livres na atividade das peroxidases podem ser tóxicos para microorganismos patogênicos (SUTHERLAND, 1991). As peroxidases, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as espécies ativas de oxigênio (EAOs) de modo a livrar a célula de seu efeito deletério (YOUNG et al., 1995). Segundo Fernandes (1998), a atividade peroxidásica a partir da indução advém de uma seqüência de eventos e sinais, catalizando o último passo enzimático da biossíntese de lignina, servindo de barreira para o patógeno.

As peroxidases também são responsáveis pela deterioração oxidativa de muitos vegetais durante o armazenamento, ocasionando mudanças na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e mudança de textura dos vegetais. São enzimas resistentes a elevadas temperaturas (LAURENTI & CLEMENTE, 2005).

Os resultados de Reimers & Leach (1991) indicam uma relação entre aumento da atividade de peroxidases e lignificação, pois verificaram que em cultivares de arroz infectados por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, ocorre um aumento na atividade de peroxidases com acúmulo de lignina no sítio de infecção, como resposta do hospedeiro ao ataque do agente infeccioso. Dann & Deverall (2000) observaram a ativação de resistência em ervilha, quando as plantas foram

tratadas com altas dosagens de ASM e isolados avirulentos de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. A ativação de resistência foi associada ao aumento da atividade de peroxidase e β -1,3-glucanase. Cavalcanti, et al (2006), ao induzirem plantas de tomate com acibenzolar-S-metil (ASM) e extratos cítricos, evidenciaram a indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria*, pelo aumento da atividade de peroxidases.

Em trabalho com fungos, Hammerschmidt; Nuckles; Kúc (1982) demonstraram que plantas de pepino inoculadas em uma folha com o patógeno *Colletotrichum lagenarium*, apresentaram uma maior proteção contra doença relacionada com aumento da atividade de peroxidases nas demais folhas. He; Hsiang; Wolyn (2002) relataram que a colonização de raízes de plantas de aspargo com o isolado não patogênico de *Fusarium oxysporum* apresentaram proteção contra o isolado patogênico de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*. As plantas tratadas com o isolado não patogênico apresentaram rápido aumento de atividades de peroxidases, fenilalanina amônia-liase e lignina em relação às plantas não tratadas.

2.3.2.2.2. β -1,3-Glucanases (E.C 3.2.1.39) e Quitinases (EC 3.2.1.14)

As β -1,3-Glucanases e quitinases fazem parte de um grupo de proteínas denominado de proteínas relacionadas à patogênese - proteínas-RP. Atualmente, são classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, na relação sorológica, na atividade enzimática, ou na atividade biológica (GUZZO, 2004). As proteínas-RPs mais pesquisadas são as β -1,3-glucanases (PR-2) e as quitinases (PR-3), que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos (LABANCA, 2002).

A família PR-2 é constituída por endo- β -1,3-glucanases e são agrupadas em pelo menos três classes distintas. As β -1,3-glucanases da classe I são proteínas básicas, localizadas no vacúolo, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas, enquanto que as classes II e III incluem,

principalmente as proteínas ácidas extracelulares (GUZZO, 2003). As proteínas-RPs presentes nos vacúolos geralmente exercem um efeito de defesa após a descompartimentalização das células, enquanto que as proteínas-RPs extracelulares atuam diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). As β -1,3-glucanases atuam na hidrólise do polímero β -1,3-glucana, componente estrutural da parede celular de muitos fungos, particularmente na extremidade de hifas em que a glucana está mais exposta, causando um enfraquecimento da parede e resultando na morte celular dos fitopatógenos (GUZZO, 2003).

A família PR-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I, II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de 18 fungos, hidrolisando os polímeros de quitina, enfraquecendo-a e tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003).

As proteínas-RP têm sido definidas como proteínas vegetais que se acumulam após o ataque de um patógeno ou situações relacionadas, como o tratamento com indutores de resistência (PASCHOLATI & LEITE, 1995). As proteínas-RP, atuando em componentes dos fitopatógenos podem liberar moléculas que são capazes de atuar como elicitores de outras respostas de defesa (LINTHORST, 1991).

O aumento de quitinases e β -1,3-glucanases relacionado à indução de resistência foi observado por Xue; Charest; Jabaji-Hare (1998). Os autores trataram plântulas de feijão com espécies não patogênicas de *Rhizoctonia* e observaram aumento da atividade de peroxidases, β -1,3-glucanases e quitinases, e relataram também, que o tratamento induziu resistência contra *R. solani* e *C. lindemuthianum* reduzindo em 80 a 100% a podridão da raiz causada por *R. solani* e 38% a antracnose causada por *C. lindemuthianum*.

Ghaouth; Wilson; Callahan (2003a) observaram que pêssegos tratados com radiação UV-C induziram o aumento de proteínas relacionadas à patogênese (quitinases, β -1,3 glucanases) e fenilalanina amônia-liase (FAL), após 6h do tratamento. Solórzano; Peteira; Fernández (1996), verificaram o aumento da

atividade de β -1,3-glucanases em plantas de tomate após a inoculação com *Alternaria solani*.

Suspensões de *Cândida saitoana* aplicadas em maçãs 48 e 72h antes da inoculação com *Botrytis cinerea* reduziram em 50 e 70% o tamanho das lesões causadas pelo patógeno. Houve aumento das atividades de β -1,3-glucanases e quitinases em maçãs após 12h do tratamento com a levedura (GHAOUTH; WILSON, WISNIEWSKI, 2003b).

Burketová; Stillerová; Feltlová (2003), observaram a indução de resistência em plantas de beterraba tratadas com os indutores benzothiadazole (BTH) e *Beet necrotic yellow vein virus*. Os dois indutores ativaram mecanismos de defesa nos tecidos das raízes por meio do acúmulo das enzimas β -1,3-glucanases e quitinases na parede celular e nos espaços extracelulares.

2.4. Cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*

2.4.1. *Agaricus blazei*

Agaricus blazei Murril é um basidiomiceto da ordem Agaricales, também conhecido por “cogumelo do sol” devido a sua característica de crescimento e desenvolvimento em campos abertos e ensolarados, requerendo, normalmente, muita luz para desenvolver os corpos de frutificação (URYU, 1995).

É nativo do Brasil e sua descoberta ocorreu na década de 60 por um pesquisador autônomo, Takatoshi Furumoto, na cidade de Piedade - SP, e é encontrado naturalmente na região sudoeste do Estado de São Paulo. Furumoto enviou o novo cogumelo descoberto para identificação na Universidade de Medicina e Farmacologia da Província de Mie, no Japão, onde foi chamado de Himematsutake e patenteado por um pesquisador dessa Universidade. Antes, porém, William A. Murrill (1869-1957) descreveu a espécie pela primeira vez em 1944 com material coletado em Gainesville na Flórida (EUA). Contudo, a identificação correta do cogumelo não está bem estabelecida, pois, o material-referência coletado por Murrill se encontra danificado, não favorecendo um estudo

comparativo entre o material obtido no Brasil com aquele obtido nos Estados Unidos (ROSA, 2006).

O cogumelo *A. blazei*, também conhecido por “Cogumelo do Sol”, tem despertado interesse surgido pela crescente demanda do mercado japonês, que é o principal comprador brasileiro. A exportação para o Japão tem sido direcionada principalmente para o mercado dos laboratórios de pesquisa que estão empenhados em isolar substâncias de uso medicinal (OLIVEIRA et al., 1999). Este consumo foi amplificado graças a estudos desenvolvidos no Japão que permitiram a descoberta e isolamento de substâncias com atividade antitumoral, presentes nesse cogumelo (KAWAGISHI; INAGAKI; KANAOKA, 1989).

De acordo com Takaku; Kimura; Okuda (2001), o “Cogumelo do Sol” é utilizado por cerca de 300 a 500 mil pessoas no Japão para a prevenção do câncer e/ou como produto natural medicinal complementar na quimioterapia após a remoção de tumores malignos. Trata-se de um produto natural cuja principal função é reforçar o sistema imunológico (MIZUNO et al., 1990).

O basidiocarpo de *A. blazei* (matéria seca) apresenta 40-45% de proteína, 38-45% de carboidratos, 6-8% de fibras, 5-7% de minerais e 3-5% de gordura, além de vitaminas B1, B2 e niacina (MIZUNO et al., 1990); e elevados teores de fósforo, potássio, magnésio, enxofre, cálcio e zinco (OLIVEIRA, et al. 1999). Também foram encontrados compostos antitumorais como polissacarídeos complexos proteínopolissacarídeos, esteróides (MIZUNO et al., 1995b) e ergosterol (TAKAKU; KIMURA; OKUDA, 2001).

MIZUNO et al. (1990), fracionando os corpos de frutificação de *A. blazei* e purificando-os, obtiveram 17 polissacarídeos que, por meio de testes com cobaias, demonstraram atividades antitumoral em camundongos, podendo ter potencial para prevenir o aparecimento de vários tipos de câncer. Dentre esses polissacarídeos, destacam-se o β -D-glucano, ácido α -D-glucano, ácido β -D-glucano e proteínas complexas de RNA. Essas glucanas também são capazes de estimular a produção de interferon e interleucinas, substâncias produzidas normalmente pelo organismo humano que previnem o aparecimento de doenças causadas por vírus (FUJIMIYA; SUZUKI; KATAKURA, 1999).

Segundo MIZUNO et al. (1998), o complexo 1,6- α -glucana e 1,4- α -glucana do cogumelo *A. blazei*, quando administrado em camundongos normais, estimulou a síntese de linfócitos, sugerindo que polissacarídeos deste cogumelo podem atuar preventivamente no tratamento contra câncer. Outro indicativo do potencial do efeito de *A. blazei* contra o câncer foi estudado por Ahn et al, (2004), que trabalhou com pacientes com câncer cervical, de ovário e endometrial, com idade variando de 26 a 79 anos, que utilizaram quimioterapia e drogas anticâncer comerciais e foram submetidos à administração oral do extrato de *A. blazei* por três semanas. Após este período, os pacientes que consumiram o extrato apresentaram aumento do número das células “natural killer” quando comparado com grupo tratado unicamente com as drogas anticâncer. As células “natural killer” exercem uma importante função no sistema de defesa dos seres humanos e são responsáveis por inibir o desenvolvimento de tumores e sua disseminação em diferentes órgãos.

O “cogumelo do sol” também pode estar relacionado ao controle de microorganismos *in vitro* e *in vivo*, pois Osaki et al. (1994) encontraram atividade antibacteriana nos extratos clorofórmicos e metanólicos do basidiocarpo de *A. blazei* que foram ativos contra *Salmonella typhimurium*. Além disso, Di Piero & Pascholati (2004a,b), demonstraram que o extrato aquoso do basidiocarpo de *A. blazei* inibiu, em média, 50% da severidade da antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lagenarium* em plantas de pepino cultivadas em casa de vegetação. Os mesmos autores também observaram uma redução significativa da severidade de mancha bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, em dois dos três testes conduzidos, em plantas de tomate, quando estas foram tratadas com extrato de basidiocarpo de *A. blazei*.

2.4.2. *Lentinula edodes*

O fungo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, conhecido comumente como shiitake (shii = tipo de árvore; take = cogumelo), pertence à classe dos Basidiomicetos (CHANG & MILES, 1989). É aeróbio e possui elevado potencial de

biodegradação em madeira, ocasionando a “podridão branca” pela decomposição de lignina (BONONI et al., 1995).

O cultivo de shiitake originou-se na China, sendo posteriormente introduzido no Japão por intermédio dos cultivadores chineses. Após, o cultivo foi estendido para os Estados Unidos e Europa (PAULA; TARSITANO; GRACIOLLI, 2001). No Brasil, o desenvolvimento da cultura de shiitake iniciou-se na década de 1980 empregando-se como substrato a madeira de *Eucalyptus* (ANGELIS et al., 1998).

Atualmente, há grande interesse no consumo de shiitake, atribuído às suas ricas propriedades nutricionais e medicinais e também pelo seu apreciável sabor, tornando-o o segundo cogumelo mais consumido no mundo (PAULA; TARSITANO; GRACIOLLI, 2001). Nutricionalmente, o shiitake é rico em proteínas, contendo, em relação à matéria seca, 17,5% de proteínas (com nove aminoácidos essenciais), 8% de lipídeos, 67,5% de carboidratos, 8% de fibras e 7% de cinzas. O conteúdo total de minerais na matéria seca é de 2,6% a 6,5%, com teores significativos de cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio. O cogumelo fresco possui 85% - 95% de água e é uma boa fonte de vitaminas, especialmente as do grupo B. (ALMEIDA; UZZO; MALUF, 1999).

Segundo BREENE (1990), desde a antiguidade, várias espécies de cogumelos têm sido utilizadas como medicamento. O valor medicinal de *Lentinula edodes* tem sido relacionado à prevenção de câncer, tratamento de infecções viróticas, de alergias ambientais, de diabetes, de pressão sanguínea elevada, de baixa imunidade, de doenças respiratórias superiores, de fadiga, de tumores e de efeitos colaterais de quimioterapia (ISMAIL, 2000). Além de possuir atividade antibiótica (SASAKI et al., 2001), pode atuar na prevenção de doenças coronarianas, na redução de colesterol, possuindo, além de tudo, atividade antitrombótica e hipoglicêmica (WASSER & WEIS, 1999).

Pesquisas sobre o potencial de *L. edodes* como agente anti-tumoral começaram na década de 60, no Japão, pela Fundação Imperial de Pesquisa de Câncer (DAWN SOO, 2002)

Segundo Dawn Soo (2002), a molécula bioativa isolada mais pesquisada de *L. edodes* é a lentinana, uma β -1,3-glucana com alta massa molecular (aproximadamente $5 \cdot 10^5$ Da), configuração de tripla hélice, solúvel em água, resistente à temperatura elevada e a ácidos e sensível a álcalis. A lentinana, extraída de extrato aquoso do corpo de frutificação de *L. edodes* foi testada em ratos, sendo aplicada por meio de injeções intraperitoniais, e inibiu em 81% o desenvolvimento tumoral de sarcoma 180, quando comparado com os ratos não tratados. Ela não é tóxica às células tumorais, age inibindo o crescimento do tumor pelo acionamento do sistema imunológico, ativando células efetoras como macrófagos, células T-helper e células “natural Killer”, e assim, proporcionando um aumento no número de anticorpos, interleucinas e interferon (MIZUNO et al. 1995).

Além da lentinana, vários compostos com propriedades medicinais têm sido isolados. A molécula KS-2 é um polissacarídeo obtido a partir do micélio de *L. edodes* e é composta principalmente pelos aminoácidos serina, treonina, alanina e prolina. Esse polissacarídeo apresenta atividade antitumoral em ratos concomitante à indução de interferon e ativação de macrófagos (SUZUKI et al., 1979, citado por TONUCCI, 2004).

Outra substância, uma glicoproteína denominada LEM (*Lentinula edodes mycelia*), constituída de galactose, xilose, arabinose, vitaminas do complexo B e ergosterol, após maceração, foi extraída do micélio de *L. edodes* junto com o meio sólido no qual o fungo cresceu vegetativamente por três a quatro meses a 22°C. O macerado foi incubado por 60 h a 50°C na presença de enzimas de ocorrência natural do micélio e o resíduo foi extraído com água (60°C) e liofilizado. Compostos do LEM e duas frações extraídas do mesmo (LAP e EP3) apresentaram atividade anticarcinogênica em animais e humanos, ativando o sistema imune do hospedeiro (SUGANO et al., 1982).

É encontrada em corpos de frutificação de *L. edodes* outra molécula bioativa, a eritadenina (purina alcalóide) que é relatada como um agente hipocolesterolêmico. A eritadenina não inibe a biossíntese do colesterol no fígado, mas aumenta a remoção do colesterol no sangue. Em estudos com ratos

alimentados com eritadenina em suas dietas, houve a redução do colesterol plasmático (ENMAN; ROVA; BERGLUND, 2007). Outros estudos com ratos sugerem que a eritadenina pode aumentar a absorção de lipoproteínas plasmáticas do colesterol pelo fígado, reduzindo assim o teor de colesterol plasmático (SUGIYAMA, et al., 1997; ENMAN; ROVA; BERGLUND, 2007).

Atualmente, trabalhos têm relatado as propriedades antimicrobianas de *L. edodes*. Extratos obtidos a partir do micélio de *L. edodes* exerceram efeito inibitório no desenvolvimento *in vitro* de quatro espécies de fungos filamentosos de importância agrícola: *Helminthosporium* sp., agente causal da helmintosporiose do trigo; *Fusarium solani*, agente causal da síndrome da morte súbita em soja; e *Phomopsis sojae*, agente causal da seca das hastes e das vagens da cultura de soja. Foram usadas três concentrações de extratos, porém, não houve diferença significativa entre as dosagens utilizadas (SASAKI, 1997).

Também na agricultura tem sido estudado o potencial do cogumelo *L. edodes* no controle de agentes patogênicos de plantas como bactérias (PACUMBABA; BEYL; PACUMBABA, 1999; GODOY & PASCHOLATI, 2004; SILVA et al., 2007) e fungos (FIORI-TUTIDA, 2003; TONUCCI, 2004; TOFFANO, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos isolados e dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*

Os isolados, na forma de pó seco de basidiocarpo dos cogumelos *Lentinula edodes* (isolado LE-95/01) e *Agaricus blazei* (isolado ABL-30), foram cedidos pela Prof^a Dra. Marli T. A. Minhoni - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu (UNESP).

O preparo dos extratos brutos (EBs) consistiu da hidratação do pó seco de basidiocarpos com água destilada na proporção de 1 grama de pó seco de basidiocarpo em 14mL de água destilada (1:14; p:v), incubados durante 24h à temperatura de 4°C. Após este período, a suspensão foi filtrada em papel filtro comum. O extrato bruto foi diluído com água destilada para a obtenção de concentrações estabelecidas para cada bioensaio. Para os testes realizados *in vitro*, os extratos aquosos foram filtrados em membrana Milipore (diâmetro do poro = 0,2µm), sob condições assépticas (DI PIERO, 2003a).

3.2. Obtenção do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

O fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (registro nº 121) foi adquirido da Coleção de Culturas de Fitobactérias – IBSBF do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico – Campinas-SP, por intermédio do curador, Dr. Júlio Rodrigues Neto. A bactéria liofilizada foi repicada em microtubos de ensaio contendo água destilada esterilizada. Os microtubos foram mantidos congelados para posteriores repicagens, conforme sugestão do instituto que forneceu as bactérias. Quando da necessidade de inóculo bacteriano para os testes, os microtubos contendo as bactérias foram descongelados e a suspensão bacteriana foi repicada para o meio nutritivo nutriente-ágar (NA). As placas foram incubadas em ambiente escuro à temperatura de 28°C durante dois dias.

3.3. Efeito *in vitro* dos cogumelos sobre *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

Tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada receberam extratos aquosos de *L. edodes* (LE-95/01) e *A. blazei* (ABL-30) (preparados conforme item 3.1), de modo a obter-se concentrações finais de 10%, 20%, 30% e 40% (v/v). O tratamento controle foi representado por tubos contendo somente água estéril. Posteriormente, adicionou-se 1mL de suspensão bacteriana em cada tubo, de modo que a concentração final fosse de 10^8 ufc/mL. O ensaio foi conduzido com quatro repetições por tratamento, de modo que cada tubo representou uma repetição. Os tubos contendo os extratos com a suspensão bacteriana foram mantidos no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Ao final desse período, alíquotas de 300 μL de cada tubo foram pipetadas em placas de Petri contendo meio nutriente-ágar (NA) e espalhadas por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. A avaliação dos resultados foi efetuada por meio da suspensão bacteriana obtida em cada placa, pela adição de 10mL de água destilada e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 550nm (PICCININ, 2000). Os resultados foram submetidos à análise de variância e feita a regressão, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.4. Indução de resistência em plantas de maracujazeiro por extratos aquosos dos cogumelos

As mudas de maracujazeiro foram produzidas no viveiro de mudas orgânicas da Fazenda Experimental de Iguatemi – UEM, utilizando-se para isto dois substratos: substrato 1 (SB) - solo de barranco; substrato 2 (SBC) - 40% de solo de barranco + 40% de composto orgânico + 20% de volumoso (casca de arroz). Os substratos foram corrigidos com 1,0kg de calcário/m³ de substrato e 0,5Kg de Yorim/m³ (adubo fosfatado) de substrato. A desinfestação do solo foi feita por meio de solarização durante 30 dias e os substratos foram analisados quimicamente (micro e macronutrientes).

Neste experimento, utilizaram-se as cultivares de maracujazeiro IAC-275 e Epagri Oval Grande, semeando-se 2 sementes por vaso (sacos de polietileno com capacidade para 2L). Os vasos foram mantidos sob telado de sombrite com redução de 30% da luz total para evitar herbivoria. As mudas foram mantidas num regime de rega diária. Os tratamentos foram: testemunha (sem tratamento); biofertilizante Agro-mos® 1%; extrato aquoso de cogumelo *A. blazei* 20%; extrato aquoso de cogumelo *A. blazei* 40%; extrato aquoso de cogumelo *L. edodes* 20%; e extrato aquoso de cogumelo *L. edodes* 40%. A aplicação dos tratamentos iniciou-se quando as mudas apresentavam entre 4-6 folhas. As pulverizações foram semanais sendo realizadas em toda a planta até o ponto de escorrimento, durante quatro semanas.

Foi utilizado o experimento fatorial em delineamento inteiramente casualizado, sendo: 10 repetições, duas variedades, dois tipos de solo e seis tratamentos indutores que totalizaram 240 vasos.

Para avaliar a atividade enzimática induzida à planta pelos tratamentos, foram realizadas coletas de folhas, sete dias após a primeira pulverização e sete dias após a última pulverização. As amostras foram acondicionadas em geladeiras de isopor contendo gelo e transportadas imediatamente ao laboratório para o processamento, visando o armazenamento em congelador (-20°C) para posterior análise experimental.

3.4.1. Obtenção dos extratos protéicos

As amostras de tecido vegetal foram maceradas com nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz. O pó de folhas resultante foi homogeneizado em 4,0mL de tampão acetato de sódio 100mM (pH 5,0) e centrifugado a 20.000g por 10 minutos. O sobrenadante (extrato protéico) foi armazenado em *freezer* até o momento da determinação da atividade das enzimas β -1,3-glucanases e quitinases.

3.4.2. Determinação da atividade de peroxidases

As amostras de tecido vegetal foram homogeneizadas em 2,0mL de tampão fosfato 0,1M (pH 6,0) (tampão de extração) e submetidas à centrifugação a 10.000rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas (BRADFORD, 1976). A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C por meio de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470nm (RONCATTO & PASCHOLATI, 1998). Em cubeta de vidro, com capacidade de 3,0mL, foram adicionados 2,9mL de tampão de reação (250µL de guaiacol e 306µL de peróxido de hidrogênio em 100mL de tampão fosfato 0,1M (pH 6,0)) e 0,1mL de extrato protéico (sobrenadante). A cubeta de referência continha 3,0mL da solução de tampão de reação. A atividade específica da enzima peroxidase foi expressa em variação de absorbância a 470nm/min/mg de proteína.

3.4.3. Determinação da atividade de β -1,3-glucanases

A atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados de laminarina, por meio do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) (LEVER, 1972). Foram preparados dois tubos de ensaio de mistura de reação por amostra. Um tubo (por amostra) consistiu de 150µL do extrato protéico e 150µL de laminarina (2,0mg/mL), e o outro consistiu somente de 150µL do extrato protéico. Preparou-se também um tubo controle por lote de amostras preparadas que consistiu em 150µL de solução de tampão de extração (tampão acetato de sódio 100mM (pH 5,0)) e 150µL de laminarina. Os tubos foram incubados a 40°C por 1h (ABELES e FOENCE, 1970). Após esse período, foi acrescentado 150µL de laminarina (2,0mg/mL) às misturas que foram incubadas somente com o extrato protéico. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 30µL de cada tubo e a cada alíquota foi acrescentado 1,5mL de solução de hidrazida álcali 0,5% (hidrazida do ácido *p*-hidrobenzóico – PAHBAH preparada a 2,5% de HCl 0,5M e NaOH 0,5M). Os tubos contendo essa nova mistura foram

incubados a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a 25°C e procedeu-se à leitura da absorbância a 410nm contra o controle. O resultado final foi a diferença entre as absorbâncias do tubo que foi incubado com laminarina e do tubo que foi incubado sem laminarina. A diferença das leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para a glicose e o resultado expresso µg de glicose/mg de proteína.

3.4.4. Determinação da atividade de quitinases

A atividade de quitinases foi avaliada pelo método de Hackman & Goldberg (1964), pela quantificação espectrofotométrica indireta do Remazol Violeta Brilhante liberado de Chitin Azure (SIGMA). A mistura de reação constituiu de 900 µL da solução de substrato (1% (p/v) de Chitin Azure em tampão fosfato 50mM pH 6,0) e 100µL do extrato. Na mistura de reação-controle, o extrato foi substituído por tampão de extração no mesmo volume. A reação desenvolveu-se por 48h a 25°C sob agitação seguindo-se de centrifugação a 10.000rpm durante 10 minutos. Após, foi determinada a absorbância a 575nm. Calculou-se a diferença entre o valor de absorbância de cada amostra e valor de absorbância do controle. Os resultados finais foram expressos em unidades de quitinase. Uma unidade de quitinase correspondeu à variação de 0,001 no valor de absorbância por µg de proteína total.

Para a avaliação de todas as enzimas, foi calculada a média dos resultados da primeira e segunda coleta. Com as médias, calculou-se a atividade específica do período de tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo realizado desdobramento quando houve efeito significativo da interação, pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Não foi realizado o desdobramento entre os tipos de solo. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.5. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais presentes no extrato foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976). Em cada 0,8mL de amostra foram adicionados sob agitação 0,2mL de reagente concentrado de Bradford. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorbância a 595nm. Como referência foi utilizado 0,8mL de água destilada e 0,2mL de reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,8mL de amostra (μg proteína), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 μg .

3.5. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em plântulas de maracujazeiro, por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para verificar a transmissibilidade da bactéria para plântulas de maracujazeiro, 400 sementes de cada uma das cultivares Epagri Oval Grande, IAC-275 e 400 sementes de frutos obtidos com produtores da região de Maringá (sem variedade específica), foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia desinfestada em coletor solar (sete dias) e mantidas em casa de vegetação com o regime de rega diária. Cada bandeja recebeu 100 sementes, totalizando quatro repetições de 100 sementes em cada tratamento.

Plântulas com cerca de 15 dias foram coletadas e submetidas à técnica de PCR - Reação de Polimerização em Cadeia, com “primers” específicos para a bactéria. Foi feita uma análise por repetição, onde as plântulas coletadas em cada repetição foram picadas e misturadas. Em seguida foi realizada a extração do DNA total das amostras de tecido vegetal segundo MURRAY & THOMPSON, 1980 (modificado) e a extração de DNA genômico das bactérias foi realizada segundo Dunigan (1997). Para a reação de PCR utilizaram-se dois “primers” específicos de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (GONÇALVES & ROSATO, 2002), Pas-R (5'-CACAGCTGCCATGATGAG-3') e Pas3-D (5'-GAGGCGTTTTTGGGACCC-3'). Para a reação foram utilizados 1,5mM de MgCl_2 ,

100mM de dNTP, 1,5mM de cada “primer” e 0,5U de *Taq* DNA polimerase. As condições de amplificação para ambos os pares de “primers” foram: 1 ciclo de 94°C/3min e 35 ciclos (94°C/1min, 58°C/1min e 72°C/1min). Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose 1,0%.

3.6. Efeito dos extratos de cogumelos na emergência de plântulas de maracujazeiro

Para verificar o efeito dos extratos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* na emergência de plântulas, utilizaram-se sementes da cultivar Epagri Oval Grande que foram embebidas durante 36h em água (testemunha) e 12h em água mais 24h em extrato bruto aquoso dos cogumelos, preparados conforme o item 3.1. As sementes tratadas foram semeadas em bandejas plásticas contendo substrato desinfestado em coletor solar por sete dias, constituído de 60% de solo de barranco + 30% de solo de mata + 10% de serrapilheira. Cada tratamento constituiu-se de oito bandejas com 50 sementes por bandeja, que foram mantidas em casa de vegetação com rega diária. Após 40 dias da semeadura, foi feita a contagem de plantas emergidas para verificar se havia ocorrido inibição da emergência em função dos tratamentos com cogumelos. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.7. Proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, por extratos aquosos de cogumelos aplicados por meio de tratamento de sementes e pulverização foliar

Para avaliar o efeito dos extratos de cogumelos na severidade e na incidência da bacteriose no maracujazeiro, utilizaram-se dois métodos de aplicação dos extratos: tratamento de sementes e pulverização da parte aérea.

3.7.1. Aplicação dos cogumelos por tratamento de sementes

Sementes da cultivar Epagri Oval Grande foram embebidas durante 24 h em água (testemunha), ou solução de extrato bruto de *L. edodes* ou de *A. blazei* (preparado conforme item 3.1.). Após os tratamentos, as sementes foram plantadas em vasos de polipropileno contendo solo de barranco desinfestado em coletor solar (sete dias). Foi utilizado o experimento fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição composta de quatro plantas, totalizando 16 plantas por tratamento, que foram mantidas em regime de rega diária. No momento em que as mudas apresentavam uma média de oito folhas, foi realizada a inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* por meio de cortes de tesoura previamente imersa em suspensão de inóculo bacteriano (ROMEIRO, 2001), na concentração de 10^8 UFC/mL. As plantas foram mantidas em local sombreado e em câmara úmida por 24h antes da inoculação e 24h após a inoculação. No início do aparecimento dos sintomas, em torno do décimo dia, iniciaram-se as avaliações em intervalos de dois dias, quantificando-se o número de plantas com sintomas (incidência) e a área foliar lesionada (severidade) de todas as folhas de todas as plantas, segundo a escala diagramática de MARTINS et al. (2004). Foram feitas oito avaliações. Foram calculadas a severidade, a incidência (número de plantas doentes) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os valores de AACPD foram calculados conforme equação:

$$AACPD = \sum_{i=0}^{n-1} \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde, n é o número de avaliações, x é a proporção da doença no tempo t_i , e $(t_{i+1} - t_i)$ o intervalo de avaliações consecutivas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P= 0,05$) pelo programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Os valores foram transformados em "log x " na base 10 para a severidade e AACPD e " $(x+k)^{1/2}$ " com $k = 0,1$ para a incidência, para análise estatística.

3.7.2. Aplicação dos cogumelos através de pulverização foliar

Sementes da variedade Epagri Oval Grande foram semeadas em vasos de polipropileno contendo solo de barranco desinfestado em coletor solar (7 dias). Foi utilizado o experimento fatorial em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição composta de quatro plantas, totalizando 16 plantas por tratamento, que foram mantidas em regime de rega diária. Os tratamentos foram: água (testemunha); extrato aquoso de cogumelo *A. blazei* 20%; e extrato aquoso de cogumelo *L. edodes* 20%. Os tratamentos foram realizados no momento em que as mudas estavam com 4-6 folhas, por meio de pulverização em toda planta até o ponto de escoamento, durante três semanas, sendo as pulverizações semanais. Sete dias após a última pulverização, foi realizada a inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* por meio de cortes de tesoura previamente imersa em suspensão de inóculo bacteriano (ROMEIRO, 2001), na concentração de 10^8 UFC/mL. As plantas foram mantidas em local sombreado e em câmara úmida por 24h antes da inoculação e 24h após a inoculação. No início do aparecimento dos sintomas, em torno do décimo dia, iniciaram-se as avaliações em intervalos de 2 dias, quantificando-se o número de plantas com sintomas (incidência) e a área foliar lesionada (severidade) de todas as folhas de todas as plantas segundo a escala diagramática de Martins et al. (2004). Foram feitas oito avaliações. Foram calculadas a severidade, a incidência e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os valores de AACPD foram calculados conforme equação anteriormente descrita no item 3.7.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito *in vitro* dos cogumelos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Nos testes *in vitro* dos extratos aquosos de *L. edodes* sobre a bactéria fitopatogênica *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Figura 1), por meio da análise de regressão por polinômios ortogonais (Teste F, $p=0,05$) da absorbância, o modelo ajustado foi linear, observando-se inibição do desenvolvimento da bactéria nas concentrações testadas. Essa inibição foi dose dependente, pois aumentou com o aumento da concentração do extrato.

Em relação ao efeito dos extratos aquosos de *A. blazei* (Figura 2), ressaltou-se pela análise de regressão por polinômios ortogonais (Teste F, $p=0,05$), um modelo exponencial no qual o maior valor alcançado ocorreu na concentração de 20% com o valor de absorbância de 0,919UA, ou seja, houve efeito estimulatório inicial para o desenvolvimento da bactéria até a concentração de 20% e, após, ocorreu um declínio desse efeito estimulatório do desenvolvimento bacteriano. Porém, na concentração máxima testada (40%), não houve efeito inibitório em relação aos testes sem extrato do cogumelo.

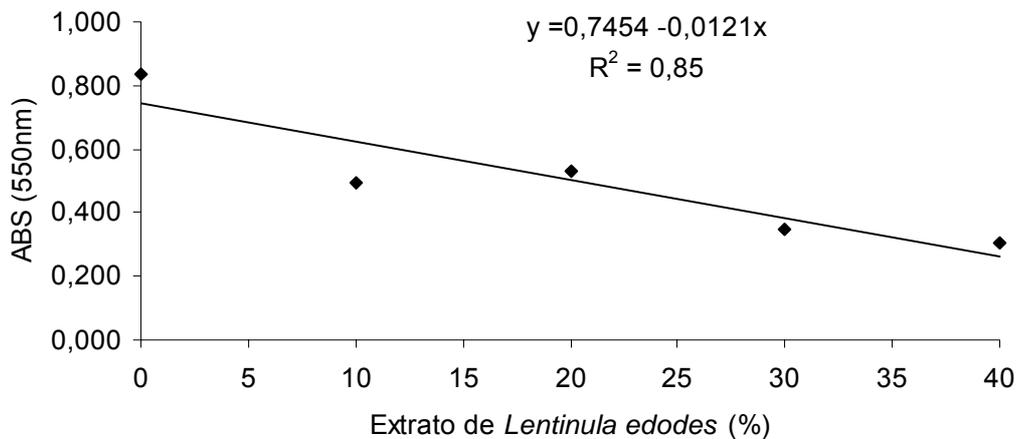


Figura 1. Efeito de extratos de *Lentinula edodes* sobre o desenvolvimento *in vitro* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

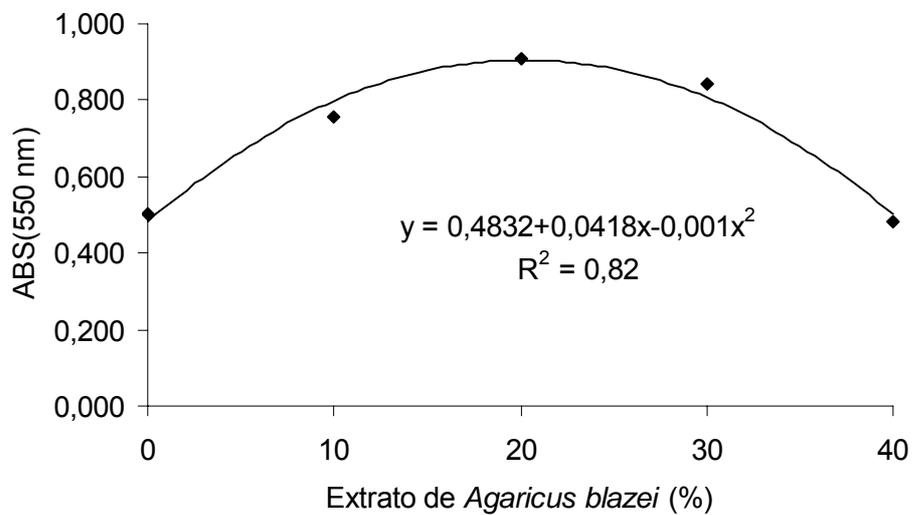


Figura 2. Efeito de extratos de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento *in vitro* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

A atividade antimicrobiana de *L. edodes* já foi verificada por vários autores. Pacumbaba; Beyl; Pacumbaba (1999) comprovaram a atividade inibitória do lixiviado de micélio de *L. edodes* contra várias bactérias como *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Hatvani (2001) verificou que o fluido de cultura de *L. edodes* agiu como bacteriostático contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium*, Sasaki et al. (2001), ao incorporarem ao meio BDA extrato aquoso de *L. edodes* nas concentrações de 10%, 20% e 30%, verificaram efeito inibitório sobre os fungos *Helminthosporium euphorbia*, *Helminthosporium* sp. e *Phomopsis sojæ*. Piccinin (2000) verificou que tanto o filtrado de basidiocarpo como o filtrado de estipe de *L. edodes* apresentaram efeito inibitório na esporulação de *Exserohilum turcicum* em concentrações superiores a 10%. Ishikawa (1998) avaliou a atividade antibacteriana *in vitro* de um isolado de *L. edodes* sobre 20 espécies de bactérias decompositoras de alimentos e verificou uma maior inibição em bactérias Gram positivas, sugerindo que a atuação de substância inibidora pode ocorrer sobre a parede celular. Nesse estudo, a bactéria *Bacillus subtilis* foi a mais sensível. Posteriormente, foi testada a atividade antibacteriana de 35 isolados de *L. edodes* em *B. subtilis* onde todos os isolados provocaram a inibição da bactéria (ISHIKAWA; KASUYA; VENETTI, 2001).

Fiori-Tutida (2003); Fiori-Tutida et al (2007) ao testarem, *in vitro*, várias concentrações de extrato de *L. edodes* e *A. blazei* (0,1%, 1,0%, 10% e 40%) em *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e *Bipolaris sorokiniana*, observaram que os extratos dos cogumelos inibiram significativamente a germinação de esporos de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, no entanto, os extratos de ambos os cogumelos não tiveram efeito significativo tanto no crescimento micelial quanto na germinação dos esporos de *B. sorokiniana*. Segundo Del Signore; Romeo; Giaccio (1997), os cogumelos do gênero *Agaricus* apresentam substâncias fenólicas em sua

composição que são conhecidas por possuírem algumas propriedades antibacterianas ou inibidoras de microorganismos.

Porém, resultados divergentes podem ocorrer, pois alguns isolados de cogumelos podem apresentar maior ou menor concentração de substâncias inibitórias ou diferir na composição e na atividade dessas substâncias (TONUCCI, 2004). Por exemplo, Silva (2007), realizou testes *in vitro* com os extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei* nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, em *Clavibacter michiganensis* subsp. *solanacearum* e constatou que nenhum extrato inibiu o crescimento da bactéria. Em alguns tratamentos, os extratos chegaram a estimular o crescimento, mostrando que ao contrário de um possível efeito antibiótico, ocorreu, provavelmente, uma melhoria na condição nutricional do meio de desenvolvimento das bactérias. Em testes *in vitro* realizados com os mesmos extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* com a bactéria *Ralstonia solanacearum*, não ocorreu inibição significativa do crescimento bacteriano (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007). Também, Di Piero & Pascholati (2004a), utilizando extratos de isolados de *L. edodes* e *A. blazei* para teste *in vitro* com a bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, verificaram que os extratos de *L. edodes* não apresentaram efeito inibitório sobre a bactéria e que os extratos de *A. blazei* chegaram a estimular seu crescimento.

Trabalhos de Piccinin (2000) e Tonucci (2004) corroboram os resultados deste trabalho. PICCININ (2000) verificou que extratos de basidiocarpos e estipe de *L. edodes* na concentração de 2%, incorporados ao meio de cultivo, reduziram a multiplicação da bactéria de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Tonucci (2004) também verificou o efeito *in vitro* de extratos aquosos de basidiocarpos de quatro isolados *L. edodes* nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% sobre *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, e observou que todos os isolados proporcionaram redução significativa até a concentração de 15%. A mesma autora verificou que extratos de basidiocarpos autoclavados, na concentração de 20%, resultaram na perda da atividade biológica sobre o crescimento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Portanto, extratos de *L. edodes* podem exercer efeito antibiótico contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e extratos de *A. blazei* podem, dependendo da

concentração utilizada, atuar como promotor do desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

4.2. Indução de resistência em plantas de maracujazeiro por extratos aquosos dos cogumelos

Os resultados da atividade de peroxidases da cultivar IAC-275 (Quadro 1) mostraram que os tratamentos realizados com o cogumelo *A. blazei* 20% e 40% foram superiores à testemunha quando o cultivo foi realizado em solo de barranco, apresentando um incremento acima de três vezes. O tratamento com *A. blazei* 20% foi superior à testemunha quando o cultivo foi em solo de barranco com composto orgânico. Embora, numericamente todos os tratamentos tenham tido valores maiores que a testemunha, estatisticamente, nem todos apresentaram diferença significativa.

Quadro 1. Atividade de peroxidases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade IAC-275, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	0,4059 b	0,5467 b
Agro-Mos®	0,6087 b	0,7433 b
<i>Agaricus blazei</i> 20%	1,1510 a	1,6716 a
40%	1,1278 a	0,7234 b
<i>Lentinula edodes</i> 20%	0,5281 b	0,8775 b
40%	0,5059 b	0,8094 b

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em Abs/min/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

Em relação à variedade Epagri Oval Grande (Quadro 2) cultivada em solo de barranco, os tratamentos com *A. blazei* 20% e *L. edodes* 40% mostraram-se superiores à testemunha. Para o solo de barranco com composto orgânico, os tratamentos com *A. blazei* 20% e 40%, *L. edodes* 40% e o controle positivo Agro-Mos® foram estatisticamente superiores à testemunha. Os resultados com o Agro-Mos® foram discrepantes, pois no solo de barranco o resultado foi numericamente inferior à testemunha e no solo de barranco com composto obteve-se valor estatisticamente maior que a testemunha e mais de duas vezes maior que o valor alcançado para o solo de barranco.

Quadro 2. Atividade de peroxidases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade Epagri Oval Grande, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	0,5982 b	0,5213 b
Agro-Mos®	0,3728 b	0,7960 a
<i>Agaricus blazei</i> 20%	0,8490 a	0,6764 a
40%	0,4609 b	0,7457 a
<i>Lentinula edodes</i> 20%	0,5557 b	0,5365 b
40%	0,8819 a	0,8075 a

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em Abs/min/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

Pôde-se observar que a atividade de β -1,3-glucanases (Quadro 3) para a variedade IAC-275 cultivada em solo de barranco, apresentou aumento significativo dos valores, em relação à testemunha, para os tratamentos com *L.*

edodes 20% e 40% e o controle, porém, o valor obtido com o tratamento com *A. blazei* 20% foi significativamente inferior. Em solo de barranco com composto orgânico os tratamentos com *A. blazei* 40% e *L. edodes* 20% e 40% apresentaram valores superiores à testemunha e ao controle. Tais resultados demonstram que o cogumelo *L. edodes*, nas duas concentrações utilizadas, proporcionou uma maior atividade de β -1,3-glucanases nos dois solos testados.

Quadro 3. Atividade de β -1,3-glucanases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade IAC-275, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	0,560 b	0,537 b
Agro-Mos®	1,031 a	0,533 b
<i>Agaricus blazei</i> 20%	0,293 c	0,432 b
40%	0,524 b	0,710 a
<i>Lentinula edodes</i> 20%	0,871 a	0,716 a
40%	0,887 a	0,881 a

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em μg de glicose/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

A atividade de β -1,3-glucanases (Quadro 4), na variedade Epagri Oval Grande, não apresentou aumento significativo nos diferentes tratamentos indutores e nos dois tipos de solo, em relação à testemunha. Além disso, em solo de barranco, os tratamentos com *L. edodes* 20% e 40% proporcionaram, ainda, uma diminuição significativa dos valores quando comparados à testemunha. E em solo de barranco com composto, todos os tratamentos apresentaram valores significativamente inferiores à testemunha.

Quadro 4. Atividade de β -1,3-glucanases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade Epagri Oval Grande, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	0,717 a	0,928 a
Agro-Mos®	0,849 a	0,549 b
<i>Agaricus blazei</i> 20%	0,830 a	0,663 b
40%	0,852 a	0,398 b
<i>Lentinula edodes</i> 20%	0,377 b	0,541 b
40%	0,489 b	0,547 b

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em μ g de glicose/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

Para a atividade de quitinases, observou-se que os tratamentos com *A. blazei* 20% e 40%, na variedade IAC-275 (Quadro 5) cultivada em solo de barranco, promoveram aumento significativo dos valores quando comparados à testemunha. Os demais tratamentos da variedade não diferenciaram significativamente da testemunha. Em relação à cultivar Epagri (Quadro 6), nenhum tratamento diferenciou da testemunha.

Quadro 5. Atividade de quitinases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade IAC-275, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	1,105 b	1,123 b
Agro-Mos®	1,338 b	1,207 b
<i>Agaricus blazei</i> 20%	1,811 a	1,239 b
40%	2,083 a	1,521 b
<i>Lentinula edodes</i> 20%	1,458 b	1,277 b
40%	1,561 b	1,393 b

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em unidades de quitinase/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

Quadro 6. Atividade de quitinases em folhas de plantas de maracujazeiro variedade Epagri Oval Grande, tratadas com extratos dos cogumelos e cultivadas em solo de barranco (SB) e solo de barranco + composto orgânico (SBC)

Tratamentos	SB*	SBC*
Testemunha (água)	0,971 a	1,019 a
Agro-Mos®	1,639 a	1,176 a
<i>Agaricus blazei</i> 20%	1,343 a	0,988 a
40%	1,357 a	1,337 a
<i>Lentinula edodes</i> 20%	1,347 a	1,284 a
40%	1,420 a	1,195 a

*Valores calculados pela média dos dados da primeira coleta (7 dias após o primeiro tratamento) e da segunda coleta (7 dias após o último tratamento). Valores expressos em unidades de quitinase/mg de proteína. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

As análises bioquímicas feitas mostraram que a enzima quitinase, com exceção dos tratamentos com *A. blazei* para a cultivar IAC-275 em solo de barranco, não apresentou atividade superior à testemunha. Isso pode ser um indício de que a enzima não apresenta a capacidade para ser uma boa indicadora de resistência quando se utilizam os cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* como indutores de resistência, uma vez que, praticamente não houve acúmulo da enzima em plantas tratadas com cogumelos e com o indutor de resistência Agro-Mos®. Mas, apesar dos resultados, a magnitude de expressão das enzimas pode ter sido subestimada, uma vez que não houve a inoculação com o agente patogênico.

Nas plantas de maracujazeiro, mesmo as não induzidas (testemunhas), observou-se atividade das enzimas estudadas. É importante lembrar que algumas proteínas relacionadas à patogênese podem estar presentes na planta de forma constitutiva, porém, em baixas concentrações, aumentando significativamente como resultado da indução de sua síntese por substâncias eliciadoras da própria planta ou do patógeno (XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998).

Apesar de todas as funções biológicas das peroxidases não serem totalmente compreendidas, sabe-se que elas têm importante papel na biossíntese e lignificação da parede celular secundária que está relacionada com a resistência a patógenos. Peroxidases específicas, como as de guaiacol, catalisam a oxidação de álcoois fenólicos à lignina, ao mesmo tempo reduzem peróxido de hidrogênio à água (RESENDE, 2007). Já foi demonstrada uma correlação positiva entre a lignificação da parede secundária e a proteção de pepino contra *Cladosporium cucumerum* (HAMMERSCHMIDT et al., 1984, citados por XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998) e de várias curcubitáceas contra *C. lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* (SMITH & HAMMERSCHMIDT, 1988).

A atividade de peroxidases na cultivar Epagri Oval Grande foi maior nas plantas cultivadas em solo de barranco com composto orgânico, observando-se que os valores obtidos pelas plantas sem tratamento (testemunhas) foram estatisticamente iguais, indicando que o substrato pode interferir na atividade desta enzima quando realizados os tratamentos com os cogumelos. Comparando-

se o desempenho das duas variedades, observou-se que os incrementos da atividade de peroxidases foram maiores na variedade IAC-275 do que na variedade Epagri Oval Grande. A resposta da atividade enzimática pode variar em função da cultivar. Segundo (CAMPOS et al., 2004), a atividade de peroxidase foi significativamente maior na cultivar de feijão AB-136, do que nas cultivares Rio Tibagi, Carioca e Macanudo quando estas foram submetidas a tratamentos com ácido salicílico, patótipo não virulento de *Colletotrichum lindemuthianum* (fungo indutor) e o patótipo virulento 33/95 de *C. lindemuthianum*.

Vários estudos demonstraram aumento da enzima peroxidase ocorrido por tratamento com indutores de resistência. Xue; Charest; Jabaji-Hare (1998), usando isolados de *Rhizoctonia solani* binucleada não patogênicos como indutores de resistência, detectaram um aumento da atividade de peroxidases em tecido de feijão não inoculado, conferindo, assim, proteção contra patótipo virulento de *R. solani* e *C. lindemuthianum*. Siegrist et al. (1997) verificaram uma alta produção enzimática de peroxidases em fluidos intercelulares de folhas de feijoeiro induzidas e inoculadas com *Uromyces appendiculatus*, quando comparadas com o controle, relacionando a resistência com o fato do patógeno crescer no apoplasto. Di Piero (2003a), verificando o controle da mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pela utilização de extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*, observou a ocorrência do aumento da atividade de peroxidases nas plantas de tomate tratadas com *A. blazei*. Silva (2007) verificando a indução de resistência em plantas berinjela contra *Ralstonia solanacearum*, utilizou extratos de isolados de *L. edodes* e *A. blazei* e também o indutor químico ASM, constatando um aumento na atividade de peroxidases em plantas tratadas com *A. blazei* e ASM. Em teste enzimático com plantas de sorgo e milho tratadas com suspensão de células ou filtrados de *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que houve alteração na atividade de peroxidases, provavelmente, pelo fato da planta “reconhecer” a levedura ou seus metabólitos em resposta a um possível invasor (RONCATTO & PASCHOLATI, 1998).

Neste trabalho, a atividade da enzima β -1,3-glucanases foi diferenciada em função da cultivar e do tipo de solo. A cultivar IAC-275 apresentou valores superiores à testemunha nos tratamentos com *L. edodes* 20% e 40% nos dois tipos de solo, mas a cultivar Epagri Oval Grande obteve valores maiores em suas testemunhas do que a cultivar IAC-275, a ponto de não haver resultados significativamente maiores que os das testemunhas.

A enzima quitinase não apresentou grande incremento dos seus valores nas duas cultivares, com exceção dos tratamentos com *A. blazei* 20% e 40% no solo de barranco com a cultivar IAC-275.

Em estudos realizados por Dalisay & Kúc (1995), a atividade da enzima β -1,3-glucanases foi baixa nas plantas de pepino induzidas e não teve aumento significativo nos diferentes dias após a indução, quando comparada com a atividade das plantas não induzidas, resposta que corrobora com o presente trabalho. Mesmo fato aconteceu com Osswald et al. (2004) ao estudarem o patossistema sorgo/*Colletotrichum graminicola*. Os autores observaram que apesar da indução na produção de fitoalexinas diretamente proporcional a um aumento na dose de ASM, ocorreu uma redução na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

Resultados diferentes foram encontrados por Di Piero & Pascholati (2004b) que verificaram que o extrato aquoso de um isolado de *A. blazei* reduziu significativamente a severidade da mancha bacteriana em tomateiro, em casa de vegetação, quando o extrato foi aplicado cinco dias antes da inoculação com o patógeno e observaram também um aumento na atividade de β -1,3-glucanases, sugerindo assim, a indução de resistência em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*. Selecionando extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro, Resende et al. (2007) quantificaram a atividade de proteínas relacionadas à patogênese estimuladas por VLA (extrato aquoso fervido de lobeira) e acibenzolar-S-metil (padrão), observando que ambos os tratamentos induziram maiores atividades de peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases em mudas de cacaueteiros, comparados às respectivas testemunhas, no período de 4 a 18 dias após a pulverização. Krisnaveni et al (1999) verificaram

a indução de quitinases e β -1,3-glucanases em plantas de sorgo expostas a vários tipos de estresses (infecção fúngica, insetos e injúrias). Os autores notaram que os níveis de enzima foram aumentados tanto em plantas resistentes como em suscetíveis. Entretanto, os padrões de indução diferiram no número de isoenzimas induzidas e suas concentrações relativas.

As enzimas quitinases e β -1,3-glucanases apresentam ação direta contra patógenos fúngicos, degradando a parede celular com o objetivo de impedir o estabelecimento de relações parasíticas estáveis e a colonização (KUHN, 2007). Porém, Di Piero (2003b) relata que a proteção de tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* induzida por ASM e *A. blazei* permanece não esclarecida, uma vez que o patógeno não apresenta quitina ou β -1,3-glucana em sua parede celular. Segundo o autor, essas enzimas podem não ter efeito direto contra a bactéria, mas contribuir para a criação de um ambiente desfavorável ao patógeno nos espaços intercelulares, onde ocorre a colonização. Schneider & Ulrrich (1994) sugeriram um fato importante de que a indução de resistência pode ser ocasionada pelo sinergismo do conjunto de enzimas relacionadas à patogênese e não por uma enzima em particular, uma vez que não encontraram relação entre o aumento da atividade específica das enzimas quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, polifenoxidasas e fenilalanina amônia liase em plantas de pepino e fumo tratadas com indutores (extratos de *Reynoutria sachalinensis*, preparações de sílica e AS-aspirina).

As enzimas relacionadas à patogênese também estão presentes em plantas não inoculadas com o patógeno, no entanto, apresentam níveis de atividade significativamente mais baixos. Isso se deve ao fato que as enzimas podem estar presentes naturalmente no apoplasto e a liberação do sinal de ativação de defesa ocorre no contato do patógeno com a parede celular da planta. (SBALCHEIRO, 2006). A presença do patógeno após a indução altera a magnitude dos eventos bioquímicos, bem como, promove o acionamento de outros mecanismos, enquanto que plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam menor magnitude desses eventos bioquímicos. Dessa forma, plantas tratadas com indutores de resistência, embora pouco se observe

em termos de alterações bioquímicas, são protegidas e reagem de forma mais rápida e eficiente ao desafio de um patógeno (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). No presente trabalho não houve a inoculação com o patógeno. Em busca de tentar obter as mesmas condições que o agricultor teria no campo, foram realizados somente os tratamentos com os agentes indutores para a verificação da ocorrência de atividade enzimática, sem a inoculação de patógeno. Esse fato pode ter proporcionado uma menor magnitude da atividade enzimática em relação aos testes em que ocorre o desafio com o patógeno.

Vários autores, obtiveram resultados positivos em relação à atividade enzimática quando, depois de induzidas, as plantas foram inoculadas com o fitopatógeno. Nandakumar et al. (2001) induziram a resistência em arroz com *Pseudomonas fluorescens*, uma rizobactéria promotora de crescimento, e verificaram a redução da severidade da podridão da bainha causada por *Rhizoctonia solani*, correlacionada com o aumento da atividade de peroxidases e quitinases de forma bastante atenuada. Porém, a partir do momento em que as plantas foram desafiadas com o patógeno, a magnitude dessa atividade foi aumentada, o que não aconteceu com plantas que não foram induzidas, mas desafiadas com o patógeno. Plantas de cevada tratadas com extratos de folhas de primavera apresentaram aumento na atividade enzimática de β -1,3-glucanases em função do tempo em plantas tratadas com o indutor e inoculadas com *Bipolaris sorokiniana*, enquanto que nas plantas somente inoculadas com o patógeno ocorreu uma menor atividade da enzima (CARVALHO & BACH, 2004).

Resultados positivos também foram obtidos por Guzzo & Martins (1996) ao realizarem a pulverização do terceiro par de folhas de plantas de café com oito meses de idade, utilizando-se 50 mg/mL de suspensão aquosa de *Bacillus thuringiensis* (Thuricide HP Sandoz). Os autores verificaram que as atividades de β -1,3-glucanase e quitinases foram induzidas tanto local como sistematicamente, no intervalo de 4 a 25 e 11 a 25 dias, respectivamente, após o tratamento com o agente indutor. A maior proteção contra *Hemilleia vastatrix* foi alcançada no período de 7 a 18 dias após o tratamento com *B. thuringiensis* e os níveis

máximos de atividades das enzimas (β -1,3-glucanases e quitinases) foram observados entre o 11º e o 21º dia após o tratamento com o indutor.

Buscando respostas de defesa contra *Xanthomonas vesicatoria*, plantas de tomate foram tratadas com suspensão heterogênea de quitosana de micélio de *Crinipellis pernicioso* e ASM (acibenzolar-S-metil) e na avaliação da doença observou-se que as plantas tratadas e inoculadas com o patógeno apresentaram uma redução significativa de 87% da expressão da mancha bacteriana. Concomitantemente, houve aumento da atividade de peroxidases, quitinases e aumento da deposição de lignina sugerindo que as enzimas estão envolvidas na indução de resistência (CAVALCANTI, et al. 2007). Kunh (2007) verificou a atividade enzimática em plantas de feijoeiro quando estas foram tratadas com os indutores acibenzolar-S-metil (ASM) e *Bacillus cereus* antes das plantas serem desafiadas pelo patógeno causador de cretamento bacteriano comum, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. O autor observou a ocorrência da indução de resistência em função dos dois indutores utilizados, porém, para o indutor ASM a indução de resistência estava relacionada a aumentos na atividade de peroxidases, β -1,3-glucanase e quitinases, enquanto que para o indutor *B. cereus* ocorreu uma pequena atividade de peroxidases. Lusso & Pascholati (1999) estudaram a atividade da enzima peroxidase em plantas de milho inoculadas com os fungos *Bipolaris zeicola* (interação resistente) e *B. maydis* (interação suscetível). Os resultados mostraram que o material inoculado com *B. zeicola* apresentou atividade enzimática menor em relação a *B. maydis* e próxima dos valores encontrados para os tecidos das plantas não inoculadas.

Embora, neste trabalho, a atividade enzimática de peroxidases e β -1,3-glucanases tenha variado em função da cultivar utilizada, do tipo de solo e da concentração do extratos utilizados, os cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* mostraram que podem induzir a atividade dessas enzimas corroborando com os resultados obtidos por Di Piero (2003b) que investigou o potencial de *L. edodes* e *A. blazei* no controle de doenças de pepino, maracujá e tomate e verificou que estes cogumelos possuem substâncias elicitoras de defesa nas plantas, podendo auxiliar no controle de doenças

Neste trabalho tentou-se determinar também a atividade específica de polifenoloxidase, porém, não se observou atividade específica da enzima nas amostras (dados não mostrados).

4.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* em plântulas de maracujazeiro, por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Conforme a Figura 3, observa-se que em todas canaletas houve a presença de bandas correspondentes à *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (300pb) ou seja, em cada lote de 100 plântulas de cada repetição de todos os tratamentos, ocorreu a presença de pelo menos uma plântula com a bactéria que pode ter sido transportada da semente para a plântula. Mesmo existindo outros métodos para a detecção de fitopatógenos, a técnica de PCR é um método sensível e confiável.

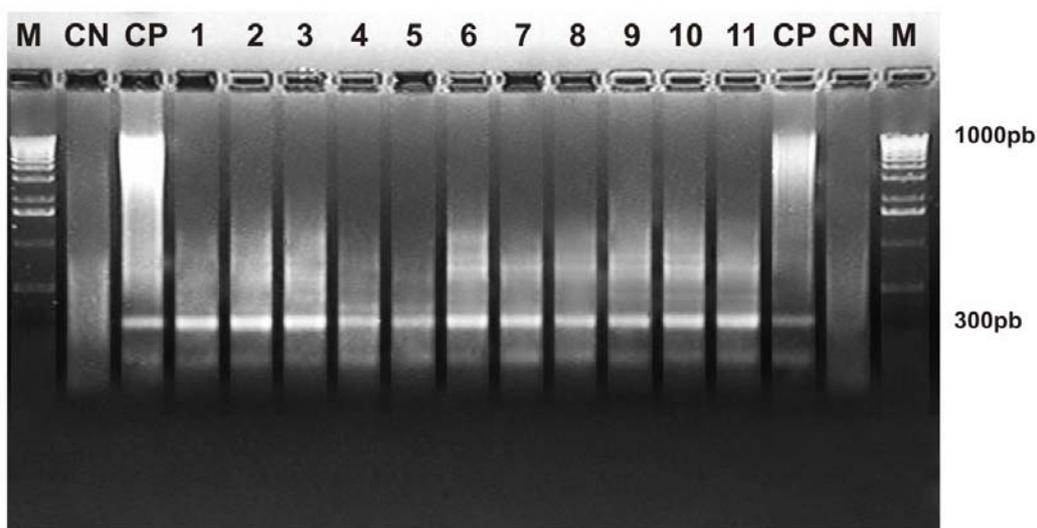


Figura 3. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em plântulas de maracujazeiro pelo método de PCR. Onde, M: marcador de peso molecular Ladder 1,0Kpb; CN: controle negativo *X. campestris* pv. *citri*; CP: controle positivo *X. a.* pv. *passiflorae*; 1, 2, 3 e 4: produtos de amplificação da cultivar Epagri; 5, 6 e 7: produtos de amplificação da cultivar IAC-275; 8, 9, 10 e 11: produtos de amplificação de plântulas de sementes de produtores da região de Maringá-PR.

Para a realização deste trabalho foram utilizados os “primers” “Pas-R” e “Pas3-D”. Gonçalves & Rosato (2002), por meio da técnica de RAPD, definiram os primers “Pas-R” e “Pas3-D” como específicos para a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* proporcionando uma única banda de cerca de 300pb. Os “primers” foram testados, por meio da técnica de PCR, em 54 isolados da bactéria representativos dos diferentes Estados brasileiros, conseguindo a especificidade para 96,3% das linhagens amostradas. Somente duas linhagens não foram detectadas pelos “primers”. Segundo os autores, os “primers” apresentam um nível de detecção de alta sensibilidade, permitindo a constatação precoce do patógeno.

Atualmente, o uso de tecnologias sofisticadas de amplificação do DNA permite a detecção de patógenos em sementes e outras partes vegetais, de maneira mais sensível que os métodos convencionais (NAMETH, 1998). Um método muito comum para a determinação de sanidade de sementes é o do papel de filtro. Martins; Lavorenti; Urashima (2004) verificaram que, por esse método, o teste realizado com sementes 100% infectadas, não apresentou transmissão do patógeno para todas as plântulas e mesmo com o plantio de sementes comprovadamente infectadas com *Pyricularia grisea*, isso nem sempre resultou em efeito deletério para plântulas. A porcentagem de plântulas saudáveis, mesmo com todas as condições aparentemente favoráveis para o desenvolvimento do fungo, atingiu 35% no método água-água. Deste modo, métodos mais sensíveis de detecção são recomendados. Ruano-Rosa et al. (2007) compararam os métodos convencional e molecular de detecção de microorganismos para o fungo *Rosellinia necatrix*, causador da podridão branca da raiz em plantas de abacate na região do Mediterrâneo. A técnica de PCR mostrou-se mais eficiente que o método convencional (observação microscópica), pois das 47 amostras de raízes analisadas, o patógeno foi detectado em 37 amostras contra 24 amostras da metodologia convencional.

Segundo López et al. (2003), as técnicas moleculares são, atualmente, as mais apropriadas para detecção bacteriana. Testes de PCR providenciam um diagnóstico relativamente rápido e seguro, sem a presença de reações inespecíficas. Além do que, a quantidade inicial da seqüência alvo de DNA pode

estar na faixa de alguns picogramas ou nanogramas de bactérias/mL para serem detectados, sendo, portanto, uma técnica bastante sensível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Vários patógenos em plantas têm sido detectados com a utilização da técnica de PCR. Halfeld-Vieira et al. (2001) verificaram a viabilidade da utilização da técnica de PCR, usando “primers” considerados específicos, para a identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, visando criar bases para a utilização em diagnose rotineira e em programas de certificação de sementes. Por meio dos resultados, os autores concluíram que a utilização da técnica de PCR é adequada para esse fim.

A Clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é uma importante doença que acomete laranjais em vários estados brasileiros. No Pará, folhas e frutos de laranja “Pêra”, com sintomas semelhantes à CVC foram coletadas e submetidas ao teste de PCR com “primers” específicos para a bactéria. A doença já havia sido anteriormente assinalada no estado do Pará através da sintomatologia, porém, a presença do fitopatógeno só foi realmente comprovada por meio da detecção molecular, o que pode permitir um programa de controle da CVC (POLTRONIERI, et al. 2005).

A bactéria *Erwinia amylovora* agente causal de “fireblight” em cultura de pêra e maçã na América do Norte, Europa, região do Mediterrâneo e Nova Zelândia, também pode ser detectada, com grande sucesso, por meio de “primers” específicos com a técnica de PCR (SALM & GEIDER, 2004).

El Tassa & Duarte (2005), por meio da técnica de PCR, identificaram a bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, responsável por causar podridão-mole em tubérculos (canela-preta) em plantas de batata no Brasil. Anteriormente, a espécie *P. carotovorum* subsp. *atroseptium* era considerada responsável pela causa da doença, porém, com as técnicas moleculares foi possível identificar a subespécie em questão. Os autores afirmam que testes bioquímicos e fisiológicos demandam tempo, são trabalhosos e, além disso, a ocorrência de formas intermediárias dificulta a interpretação dos resultados,

impossibilitando, muitas vezes, a identificação correta dessas bactérias, tornando a utilização de PCR um método refinado e eficaz para identificação de bactérias.

Dreo et al. (2007) afirmam que apesar de outros métodos de detecção de fitobactérias em plantas, a técnica de PCR é um teste sensível e de confiança. Os autores testaram os “primers” desenvolvidos por Maneau, et al. (2005) para a detecção de *Xylophilus ampelinus*, bactéria causadora da necrose em videira, com baixa infestação de bactérias e obtiveram sucesso, assegurando a alta sensibilidade da metodologia.

Neste contexto, técnicas moleculares em procedimentos rotineiros de detecção de patógenos vêm sendo cada vez mais estudadas como ferramentas promissoras devido à sua maior precisão em caracterizar organismos e apresentar resultados mais rápidos no processo de identificação (LOWS; RADEMAKER; BRUJIN, 1999).

4.4. Efeito dos extratos de cogumelos na emergência de plântulas de maracujazeiro

Conforme o Quadro 7, observa-se que os tratamentos com extrato bruto de *A. blazei* e de *L. edodes* não inibiram a emergência das sementes de maracujazeiro da cultivar Epagri Oval Grande. Observa-se também que o tratamento com *A. blazei* promoveu um aumento significativo da emergência.

Quadro 7. Índice de emergência de plântulas oriundas de sementes tratadas com extratos aquosos brutos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*

Tratamentos	Emergência de plântulas*
Testemunha (água)	40,5 b
<i>Agaricus blazei</i>	47,3 a
<i>Lentinula edodes</i>	42, b
CV(%)	6,73

* Os valores de cada tratamento representam as médias de 8 repetições de 50 sementes por repetição. Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos referentes à germinação ou emergência de plântulas com sementes tratadas com cogumelos. Porém, vários trabalhos referem-se aos efeitos provocados por outras substâncias utilizadas para o controle alternativo de doenças, como por exemplo, extratos de plantas ou microorganismos. Portanto, a discussão do presente tópico foi embasada em trabalhos realizados com compostos usados em controle alternativo de fitopatógenos. A maioria dos testes são feitos em laboratório, contudo, o presente trabalho foi realizado com a semeadura de sementes em solo, em casa de vegetação, colhendo-se dados sobre a emergência das plântulas. Para haver a emergência de uma plântula, tem que ter ocorrido uma satisfatória germinação.

Neste teste foi avaliado se haveriam efeitos alelopáticos deletérios, alelopáticos estimulatórios ou nenhum efeito dos extratos brutos de *A. blazei* e *L. edodes* sobre a emergência de plântulas de maracujazeiro amarelo, uma vez que esses extratos foram testados em sementes como possíveis indutores de resistência. Além do tratamento com *A. blazei* promover maior emergência das plântulas, as mudas apresentaram, visualmente, um maior viço que as mudas tratadas com *L. edodes* e a testemunha, embora não tenha sido feita mensuração nesse sentido. Segundo a Sociedade Internacional de Alelopatia, é definida a

atividade alelopática como um processo envolvendo metabólitos especiais (aleloquímicos) produzidos por plantas, microorganismos, vírus e fungos que influenciam o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (TORRES et al., 1996). Os compostos alelopáticos podem afetar processos, tais como a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteína, a atividade de várias enzimas e a perda de nutrientes causada por efeitos na permeabilidade da membrana celular (DURIGAN & ALMEIDA, 1993).

Alguns compostos em plantas apresentam o mecanismo de ação bastante similar ao de herbicidas, podendo diminuir ou impedir a germinação e o desenvolvimento dos vegetais. O sorgo possui um potente aleloquímico, a quinona sorgoleone, que inibe a germinação e o crescimento de várias plantas (GONZALEZ; WESTON; CHENIAE, 1998).

A ação dos compostos aleloquímicos não é muito específica podendo uma mesma substância desempenhar várias funções ou só atuarem quando em presença de outros compostos em combinações e proporções específicas ou ainda, atuarem em algumas espécies e em outras não (ALMEIDA, 1990). Sementes de guanxuma tratadas com extrato aquoso de capim-limão e sabugueiro apresentaram intensa inibição da germinação (PICCOLO et al., 2007).

Inoue; Cruz; Schwan-Estrada (1998a) verificaram inibição total da germinação de sementes de soja tratadas com suspensão aquosa do óleo essencial de losna, capim limão e eucalipto na concentração de 5% e suspensão aquosa de óleo essencial de manjeriço, na concentração de 3%. Os mesmos autores (INOUE; CRUZ; SCHWAN-ESTRADA, 1998b) verificaram inibição total da germinação de sementes de soja tratadas com suspensão aquosa do óleo essencial de losna, capim limão e eucalipto na concentração de 5% e suspensão aquosa de óleo essencial de manjeriço, na concentração de 3%. Com extrato aquoso de folhas frescas de tremoço branco, sementes de soja não tiveram sua germinação inibida, mas as de alface apresentaram inibição (CORSATO et al. 2007).

Santorum et al. (2006) testaram o efeito alelopático de várias concentrações de extrato aquoso de erva-doce para a germinação de alface, picão-preto e capim colonião. Para a alface, as concentrações de 20%, 40% e 60% não diferiram da testemunha e as demais (80% e 100%) inibiram a germinação. No caso do capim colonião, somente o extrato de concentração de 100% inibiu a germinação e em picão-preto, houve inibição da germinação em todas as concentrações, mostrando que realmente pode ocorrer diferenças quanto a atuação dos metabólitos. Buttow et al. (2004), verificaram que o extrato de fáfia não apresentou efeito alelopático sobre a germinação de sementes de alface, mas em teste com óleo essencial de alfavaca cravo (ROCHA et al., 2002) e óleo de alecrim pimenta (NAGAO et al., 2002) ocorreu a inibição da germinação. Já o extrato volátil de óleo de jaborandi estimulou o crescimento da radícula e não provocou inibição da germinação, caracterizando-se como de efeito alelopático benéfico (ALVES et al., 2004).

Foram desenvolvidos bioensaios na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), para avaliar o efeito de extratos aquosos, a frio e a quente, da parte aérea de leucena sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas de milho. O extrato obtido com água fria (EF) e aplicado ao solo não causou nenhum efeito fitotóxico sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas de milho, porém, o extrato obtido a quente, alterou o tamanho da radícula, mas não afetou a germinação (PRATES et al., 2000). Souza; Cruz; Constantin (1998), verificaram que extratos aquosos na concentração de 10%, das plantas medicinais capim limão e vetiver inibiram significativamente a germinação de sementes de mentrasto e de picão, não afetando a germinação das sementes de algodão e milho. Tokura & Nóbrega (2005), submeteram sementes de milho a extratos de parte aérea de outras gramíneas como trigo, colza, aveia preta, milheto e nabo forrageiro. Seus resultados demonstraram uma germinação superior a 80%, não havendo interferência na germinação. Esses resultados sugerem que as sementes de milho podem não ser muito sensíveis a aleloquímicos em sua germinação. Sementes de pepino também não tiveram sua

germinação influenciada quando tratadas com extrato vegetal aquoso da parte aérea da planta medicinal barbitimão (BARREIRO; DELACHIAVE; SOUZA, 2005).

Grande parte dos trabalhos envolvendo testes de germinação com sementes tratadas está relacionada a tratamentos com compostos vegetais. O presente trabalho verificou a influência de extratos de fungos sobre a germinação de maracujazeiro. Souza Filho & Duarte (2007) verificaram o extrato aquoso de filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *pipers* nas concentrações de 1,0% e 4,0%, sobre a germinação de sementes de malícia e mata-pasto. Os resultados mostraram que o extrato foi inibitório para a germinação das duas espécies testadas, sendo maior a inibição com a maior concentração do extrato. Lazzaretti & Bettioli (1997), utilizando sementes microbiolizadas com produto à base de células e metabólitos de *Bacillus subtilis*, demonstraram que o produto não afetou a emergência de plântulas de feijão, soja e trigo, em relação à testemunha e que para o teste em arroz, os resultados foram superiores à testemunha. Enquanto Paz et al. (2007), em ensaio com a microbiolização de sementes de milho e feijão com *B. subtilis* em concentração de 10^6 UFC, durante quatro minutos, observaram que ocorreu inibição de 22,79% das sementes de milho e 14,29% das sementes de feijão.

Embora a maior parte dos trabalhos sejam relacionados à germinação, Rodrigues et al. (2006) avaliaram também a porcentagem de emergência de plântulas de trigo tratadas por imersão com várias concentrações de extrato bruto aquoso (autoclavado e não autoclavado) de alfavaca. Os autores observaram que todos os tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação à testemunha.

4.5. Proteção de plantas de maracujazeiro, em casa de vegetação, por extratos aquosos de cogumelos aplicados por meio de tratamento de sementes e pulverização foliar

Em relação às mudas obtidas de sementes tratadas com extrato bruto de *L. edodes* e *A. blazei*, ocorreu redução tanto da severidade, quanto da incidência

da doença, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos para AACPD (Quadro 8).

Pode-se observar que os extratos de *L. edodes* e *A. blazei* diminuíram significativamente a severidade da bacteriose em maracujazeiro quando o tratamento de cogumelos foi realizado por aspersão nas mudas, embora a AACPD tenha sido significativamente menor somente para o cogumelo *L. edodes*. Contudo, não ocorreu diferença significativa na incidência da doença (Quadro 9).

Mesmo quando os cogumelos afetaram a incidência da bacteriose (Quadro 8) não ocorreu 100% de incidência nas plantas inoculadas, incluindo as testemunhas.

As plantas que tiveram suas sementes tratadas com os extratos brutos dos cogumelos, provavelmente tiveram mecanismos de defesa ativados, uma vez que os tratamentos com cogumelos evidenciaram uma menor incidência e severidade da doença. Nos tratamentos em que as plantas foram totalmente aspergidas com os extratos dos cogumelos, não se pôde observar se houve indução localizada e/ou sistêmica.

Quadro 8. Efeito dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* na severidade, incidência e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em plantas provenientes de sementes tratadas da cultivar Epagri Oval Grande cultivadas em solo de barranco

TRATAMENTO	Severidade (%)*	Incidência (%)*	AACPD severidade
Testemunha (água)	20,424 a	56,25 a	155,263 a
<i>Agaricus blazei</i>	9,552 b	37,50 b	78,178 a
<i>Lentinula edodes</i>	7,706 b	29,70 b	62,446 a
CV%	20,96	14,71	11,75

* Avaliadas 26 dias após a inoculação. Médias nas colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

Quadro 9. Efeito dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* na severidade, incidência e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em plantas tratadas na parte aérea

TRATAMENTOS	Severidade (%)*	Incidência (%)*	AACPD severidade
Testemunha (água)	24,646 a	71,88 a	176,615 a
<i>Agaricus blazei</i> (20%)	16,073 b	50,00 a	139,920 a
<i>Lentinula edodes</i> (20%)	12,175 b	43,75 a	78,210 b
CV%	10,03	16,33	7,54

* Avaliadas 26 dias após a inoculação. Médias nas colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade

A bacteriose causada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* é uma doença bastante importante para o cultivo de maracujazeiro, pois é de difícil controle e ainda não existem variedades resistentes. Miranda (2004) estudou o patossistema com o objetivo de avaliar a reação de oito variedades de maracujazeiro amarelo a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Após a inoculação das mudas, 100% das plantas apresentaram sintomas típicos da doença, porém, com diferentes níveis de severidade, sendo a Sul Brasil a que apresentou maior nível de resistência à doença dentre todas testadas.

Com a grande utilização de produtos tóxicos na agricultura visando o controle de doenças, as pesquisas com produtos alternativos podem ser uma ferramenta muito interessante. Neste contexto, a indução de resistência vem sendo amplamente estudada. Vários indutores bióticos e abióticos têm sido testados no controle de fitobacterioses. Kuhn (2007), trabalhando com o patossistema feijoeiro-*X. axonopodis* pv. *phaseoli*, constatou que houve redução

do crestamento bacteriano quando as plantas foram tratadas com o indutor biótico *Bacillus cereus* e o indutor abiótico acibenzolar-S-metil (ASM). No entanto, o efeito do ASM foi superior ao *B. cereus*, reduzindo a doença em torno de 79,1%, enquanto que *B. cereus* ocasionou 36,8% de proteção. Segundo o autor, a ação do indutor biótico ocorreu por meio de indução de resistência, visto que, sua aplicação foi efetuada sobre o primeiro par de folhas e o desafio com o patógeno foi efetuado sobre o primeiro trifólio, portanto, em locais diferentes da planta.

Vigo-Shultz et al. (2006), testando o potencial da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra em couve-flor, causada por *X. campestris* pv. *campestris*, trataram a terceira folha com a tintura, com água (testemunha) e calda bordalesa (controle) e inocularam a terceira e a quarta folhas com o patógeno. Os resultados mostraram redução na severidade da doença na terceira folha não diferenciando do controle. Para a quarta folha não tratada e inoculada, não foi observada diferença estatística na severidade entre os tratamentos na comparação com a testemunha (água), indicando haver somente atividade localizada da tintura na planta, e o tratamento controle com calda bordalesa comportou-se dessa mesma forma.

Alguns cogumelos têm sido pesquisados como possíveis indutores de resistência no controle de fitobacterioses. Cavalcanti et al. (2007) avaliaram o efeito de pulverizações foliares de extrato de micélio de *Crinipellis perniciosus* (MCp) e ASM em tomateiro em relação à severidade de crestamento bacteriano provocado por *X. vesicatoria*. Os autores verificaram que o melhor resultado de proteção das plantas de tomate foi conferido por ASM, que atingiu 49,3% em comparação com a testemunha e plantas pulverizadas com MCp atingiram 87,0% de proteção em relação ao desempenho do ASM.

No presente trabalho, utilizando-se extratos de *L. edodes* e *A. blazei*, observou-se uma redução da severidade em mudas tratadas e em mudas provenientes de sementes tratadas. No tratamento com *L. edodes*, não se pôde saber se ocorreu efeito antibacteriano, pois houve efeito inibitório do desenvolvimento da bactéria em cultivo *in vitro* na concentração de 20% que foi a concentração utilizada neste tratamento. No tratamento com *A. blazei*, sabe-se

que os resultados não tiveram a atuação de efeito antibacteriano, uma vez que no teste *in vitro*, a concentração de 20% chegou a estimular o desenvolvimento da bactéria.

Estudos feitos por Piccinin (2000) mostraram que o lentinan e filtrados de estipe e micélio de *L. edodes* reduziram o número de infecções locais e sistêmicas em folhas de maracujazeiro inoculadas com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, porém, o lentinan não exerceu efeito inibitório *in vitro* sobre *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, portanto, a redução dos sintomas indicaram uma possível ocorrência na indução de proteção. O mesmo autor observou que o filtrado de basidiocarpo de *L. edodes* e o lentinan reduziram a severidade das doenças causadas por *Exserohilum turcicum* e *Colletotrichum sublineolum* em plantas de sorgo. Já, Silva; Pascholati; Bedendo (2007), visando à proteção de plantas de tomate em casa de vegetação, contra murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, testaram extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*. Os autores verificaram que o extrato aquoso de *L. edodes* a 10% proporcionou a menor porcentagem de folhas murchas reduzindo a severidade em 66%. Esse aumento na resistência não ocorreu devido a uma ação direta dos indutores sobre o patógeno, uma vez que não houve atividade antibacteriana *in vitro*.

Os resultados obtidos por Di Piero (2003b) ao verificar o potencial de controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* em plantas de tomate pelo uso de extratos aquosos de basidiocarpo de isolados dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, mostraram que de maneira geral, os isolados de *L. edodes* não controlaram a bacteriose, porém, o isolado de *A. blazei* ABL 99/28, reduziu significativamente a severidade da bacteriose em dois dos três testes conduzidos em casa de vegetação. Este isolado provocou um estímulo do crescimento bacteriano *in vitro*, quando utilizado na concentração que promoveu a redução de severidade da doença, sugerindo que essa redução tenha ocorrido por indução de resistência. O mesmo autor observou efeito promissor do uso de extrato aquoso de basidiocarpo de isolados de *L. edodes* no controle da antracnose de pepino. A porcentagem de proteção, em testes conduzidos em casa de vegetação, atingiu 60-70% em termos locais e sistêmicos. O efeito dependeu

do intervalo de tempo entre a aplicação do extrato na planta e a inoculação do patógeno, da dosagem do extrato utilizada e da concentração do inóculo patogênico.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a aplicação na parte aérea dos extratos de *L. edodes* e *A. blazei* na concentração de 20% (quadro 9) diminuíram a severidade da doença. Houve diminuição da severidade e incidência da doença quando as sementes foram tratadas. No entanto, nenhuma das substâncias testadas protegeu totalmente o maracujazeiro contra a infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, mesmo assim, foi demonstrado o potencial dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* para induzir a resistência em plantas de maracujá contra a bacteriose.

Um fato interessante no experimento da casa de vegetação, não encontrado na literatura, foi a presença de um halo concêntrico em torno do ponto de penetração/infecção da bacteriose, em folhas oriundas de plantas cujas sementes foram tratadas com os cogumelos (Figura 4). Esses halos foram encontrados em número variável na face abaxial das folhas, não sendo visíveis na face adaxial. Na Figura 4 (A, B e C) observa-se a presença do halo e no centro dos mesmos, a anasarca característica do início visual da infecção com a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Nem todas as folhas e nem todas as plantas cujas sementes foram tratadas com os cogumelos apresentaram os halos, mas, as que apresentaram, os halos pareciam restringir o patógeno e a expansão da lesão, uma vez que não ocorria o desenvolvimento da doença. Visualmente, esse halo se assemelha ao descrito por Romeiro (1995) para camada de cortiça, entretanto, em análise anatômica, notou-se que esse halo era formado por células não contínuas, ricas em substância de coloração vermelha (Figura 4D, E e F), suspeitando-se da presença de antocianinas que podem apresentar efeito antimicrobiano (COOPER & RAO, 1992). Porém, a quantificação de antocianinas feitas com as folhas mostrou que não houve diferença entre a dosagem das folhas das plantas testemunhas e das folhas das plantas que as sementes foram tratadas com cogumelos. Embora a quantidade total de antocianinas não seja diferente entre os tratamentos, a alocação das antocianinas parece ser diferente, uma vez que elas podem fazer parte das células próximas ao início da lesão (halo).



Figura 4. Presença de halos concêntricos em folhas de maracujazeiro. A, aspecto externo do halo; B e C: detalhes de A com setas indicando anasarca; D, E e F: Secção transversal de folha de maracujazeiro com setas mostrando as células vermelhas formadoras do halo.

5. CONCLUSÕES

Os extratos aquosos de *Lentinula edodes* apresentaram efeito inibitório, *in vitro*, sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os extratos dos dois cogumelos proporcionaram aumento na atividade de peroxidases em função da cultivar e do tipo de solo.

Os tratamentos das sementes com extratos brutos de *L. edodes* e *A. blazei* não inibiram a emergência das plântulas de maracujazeiro

Em casa de vegetação, os extratos dos cogumelos diminuíram a severidade da bacteriose em maracujazeiro.

Em função dos resultados deste trabalho, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* mostram-se promissores como indutores de resistência para o controle da bacteriose causada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B.; FORRENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.45, p.395-400, 1970.

AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância Econômica e Mercado. In: **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M. C. (Ed.). Porto Alegre: Cinco Continentes, p.9-31, 2001.

AHN, W.S. et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murrill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **International Journal of Gynecology Cancer**, Malden, v. 14, n. 4, p. 589-594, jul. 2004.

ALMEIDA, A.R.P. A defesa das plantas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 62, p. 38-45, 1990.

ALMEIDA, B.S.V. **Análise do proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com *Xylella fastidiosa***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, 71p, 2001.

ALMEIDA, L.P.; UZZO, R.P.; MALUF, W.R. **Como Cultivar o Cogumelo Shiitake**. Boletim Técnico de Hortaliças: UFV. 1ed. Viçosa, 1999.

ALVES, M.C.S. et al. Alelopátia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11 p. 1083-1086, 2004.

ANGELIS, D.F. et al. S. **Fundamentos de tecnologia da produção de shiitake**, 24p, 1998.

BALBI-PEÑA, M.I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, (Comunicações), Brasília, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006.

BARREIRO, A.P.; DELACHIAVE, M.E.A.; SOUZA, F.S. Efeito alelopático de extratos de parte aérea de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] na germinação e desenvolvimento da plântula de pepino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1 p. 4-8, 2005.

- BERIAN, L.O.S. & MALAVOLTA JUNIOR, V.A. Doença bacteriana. In: NOGUEIRA, E. M. C & FERRARI, J. T. **Aspectos fitossanitários do maracujazeiro: Boletim Técnico**, São Paulo: Instituto Biológico, p.15-20, 2006.
- BONALDO, S.M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP. Piracicaba, 149p, 2005.
- BONALDO, S.M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.11-27, 2005.
- BONONI, V.L.R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake). (Coleção Brasil Agrícola), p.95-104, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BREENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.
- BURKETOVÁ, L.; STILLEROVÁ, K.; FELTLOVÁ, M. Immunohistological localization of chitinase and β -1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiazole treated sugar beet roots. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, n.1, p. 47-54, 2003.
- BUTTOW, M.V. et al. **Efeito alelopático, citotóxico e genotóxico do ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata* Kuntze)**. UFPel. Departamento de Zoologia e Genética. 2004. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CB_01217.rtf . Acesso em janeiro de 2008.
- CAMPOS, A.D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, jul. 2004.

CANTERI, M.G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, p. 18-24, 2001.

CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F. Morfologia Externa e Taxonomia. In: **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Agroindústria, Mercado**. Maniva, I. (Editor Geral). Porto Alegre: Cinco Continentes, p.33-49, 2001.

CARVALHO, A.S.; BACH, E.E. extrato de folhas de primavera induz resistência em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, V.71, (supl.), p.112-117, Resumo expandido, 2004.

CASTRO, R.M. Bion – A Experiência Brasileira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 117, 2003.

CAVALVANTI, F.R. et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.

CAVALCANTI, F.R. et al. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicios* mycelium activated tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Guilford, v. 26, p. 729–738, 2007.

CAVALCANTI, L.S. Ativadores de resistência disponíveis comercialmente. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 116, 2003.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, Piracicaba:FEALQ, p.81-124, 2005.

CHANG, S.T.; MILES P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**, Boca Raton: CRC Press, 345p, 1989.

COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. **Australian Cottongrower**, Austrália, v. 17, p. 76-80, 1996.

COOPER J. E., RAO R. Localized changes in flavonoid biosynthesis in roots of *Lotus pedunculatus* after infection by *Rhizobium loti*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 444-450, 1992.

CORSATO, J.M. et al., Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas frescas de tremoço branco (*Lupinus albus* L.) sobre a germinação e o crescimento inicial da alface, soja e picão preto. **XVII Semana da Biologia**. UNIOESTE. Campus Cascavel. 2007.

- COVENTRY, H.S.; DUBERY, I.A. Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis related proteins in *Nicotianae tabacum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 149-158, 2001.
- CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V. Aspectos botânicos. In: **Frutas do Brasil – Maracujá**. LIMA, A A. (Ed.). 1 ed. Brasília – DF: Embrapa, p.11-14, 2002.
- CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de Maracujazeiro. In: **Frutas do Brasil – Maracujá**. LIMA, A. A. (Ed.). 1 ed. Brasília – DF: Embrapa, p.15-24, 2002.
- DABBAS, K.M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaudadura da folha. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 328-338, 2006.
- DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 315-327, 1995.
- DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 324-332, 2000.
- DAWN SOO. **The potential of fungi used in traditional Chinese medicine: shiitake (*Lentinula edodes*)**. 2002. Disponível em: [http://www.world-of-fungi.org/Mostly Medical/Dawn Soo/Dawn Soo SSM.htm](http://www.world-of-fungi.org/Mostly%20Medical/Dawn%20Soo/Dawn%20Soo%20SSM.htm) . Acesso em: 07/07/2007.
- DEL SIGNORE, A.; ROMEO, GIACCIO, M. Content of phenolic substances in basidiomycetes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 5, p. 552-556, 1997.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 58-63, 2004a.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 243-250, 2004b.
- DI PIERO, R.M. Potencial de cogumelos comestíveis como indutores de resistência – shiitake (*Lentinula edodes*) e cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei*). **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 29, n. 1. p. 118-119, 2003a.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças de plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos.** Tese (doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 157p, 2003b.

DREO, T. et al. Development of a real-time PCR-based method detection of *Xylophilus ampelinus*. **Plant Pathology**, London, v. 56, p. 9-16, 2007.

DUNIGAN, D.D. Preparation of genomic DNA from bacteria. **Current Protocols in Molecular Biology**, Boston, p. 241-242, 1997.

DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.S. Noções sobre a alelopatia. **Boletim Técnico**, Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 28 p, 1993.

EL TASSA, O.M.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através da técnica de PCR-RFLP do gene *recA*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 23-28, 2005.

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de Mancha Bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em maracujazeiro no estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Porto Alegre: UFRGS, Notas Fitopatológicas, p. 647, 2002.

ENMAN, J.; ROVA, U.; BERGLUND, K.A. Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Select Strains of the Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, 2007, v. 55, p. 1177-1180, 2007.

FALEIRO, F. G. **Relatório Técnico de Prestação de Contas de Apoio à Eventos.** EMBRAPA / CERRADOS, Planaltina, 12p, 2006.

FERNANDES, C.F. **Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Vita 3.** (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 67p, 1998.

FERRARI, J.T. Aspectos Fitossanitários do Maracujazeiro - Introdução. In: **Aspectos Fitossanitários do Maracujazeiro: Boletim Técnico**, NOGUEIRA, E. M. C & FERRARI, J. T. (Coordenadores). São Paulo: Instituto Biológico, São Paulo, p.1-2, 2006.

FERREIRA, D.F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas.** Universidade Federal de Lavras, Lavras, 66p, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Ministério da Agricultura e Abastecimento – EMBRAPA/CENARGEN, Brasília, 220p, 1996.

FIORI-TUTIDA, A.C.G et al. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recôndita* f. sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 113-118, 2007.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extratos de Cogumelos Comestíveis e Medicinais no Controle da Ferrugem da Folha e Helmintosporiose em Trigo**. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 110p, 2003.

FRANCO, M.M.; TAKATSU, A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a cobre. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 2, n. 2, p. 207-210, 2004.

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 503-507, 2003.

FRANZENER, G. et al. Antibacterial, antifungal and phytoalexins induction activities of hydrolates of medicinal plants. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R. Tumor specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill. **Anticancer Research**, Oakland, v. 19, p. 113-118, 1999.

GHAOUTH, A.E.; WILSON, C.L.; CALLAHAN, A.M. Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia-lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Biological Control**, Orlando, v. 93, n. 3, p. 349-355, 2003a.

GHAOUTH, A.E.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Control of post harvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, Lancaster, v. 3, p. 344-348, 2003b.

GODOY M.F.P.; PASCHOLATI S.F. Crescimento do fungo *Lentinula edodes* em diferentes meios e cultivo e atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Arquivos do Instituto Biológico** (Supl.), São Paulo, v. 71, p. 147-149, 2004.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e primers específicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 20-27, 2002.

GONZALEZ, V.; WESTON, L.A.; CHENIAE, G.M. Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by sorgoleone, a natural product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v. 45, p. 1415-1421, 1998.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 235p, 2004.

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

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.

HACKMAN, R.H.; GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v. 8, p. 397-401, 1964.

HALFELD-VIEIRA, B.A. et al. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 737-740, 2001.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. **Mancha-Bacteriana do Maracujá: Sintomas, Danos e Medidas de Controle**. Comunicado Técnico nº 3. Brasília: EMBRAPA, 2006.

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, 2000. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 1007, p. 1-6, 2001.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Activity with induced systemic resistance of Cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

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

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Londres, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.

HE, C.Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D.J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 225-230, 2002.

HILAIRE, E. et al. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, n.12, p.1411-1419, 2001.

INOUE, M.H.; CRUZ, M.E.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Eficácia da planta medicinal capim limão no controle de fungos fitopatogênicos que incidem sobre sementes de trigo. Ponta Grossa, 5º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, **Resumos**, v. 1, p. 28, 1998a.

INOUE, M.H.; CRUZ, M.E.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Eficácia de plantas medicinais no controle de fungos fitopatogênicos que incidem sobre sementes de soja. Ponta Grossa, 5º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, **Resumos**, v. 1, p. 33, 1998b.

ISHIKAWA, N.K. **Atividade antibacteriana em *Lentinula edodes***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 33p, 1998.

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

ISMAIL, H.M.M. **Potential of Fungi Used in Traditional Chinese Medicine: Shiitake/shiang-gu (*Lentinula edodes*)**. 2000. Disponível em: http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/Ismail_Mokhtar/Ismail_Mokhtar.htm . Acesso em: 07/07/2007.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, France, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.

KOGEL, K. H.; LANGEN, G. Microreview: Induced disease resistance and gene expression in cereals. **Cellular Microbiology**, Baltimore, v. 7, n. 11, p. 1555–1564, 2005.

KOIKE, N. et al Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 5, p. 523-533, 2001.

KRISHNAVENI, S. et al. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. **Plant Science**, Amsterdam, v. 144, p. 9-16, 1999.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S- metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 140p, 2007.

- LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 118p, 2002.
- LAURENTI, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertrhoa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 159-163, 2005.
- LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, n.1-2, p. 89-96, 1997.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v. 47, p. 273-279, 1972.
- LIBERATO, J.R.; COSTA, H. Importância Econômica e Mercado. In: **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.). Porto Alegre: Cinco Continentes, p.243-276, 2001.
- LIMA, A.A. Introdução. In: **Frutas do Brasil – Maracujá**. LIMA, A. A. (Ed.). 1 ed. Brasília – DF: Embrapa, p.9, 2002.
- LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 10, p. 123-150, 1991.
- LÓPEZ, M.M. et al. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Madrid, v. 6, p. 233-243, 2003.
- LOWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W., BRUJIN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.
- LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.
- MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; BERIAM, L.O.S.; RODRIGUES NETO, J. Podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. V. 68, n. 2, p. 121-123, 2001.
- MAPA **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 14/09/2006.

- MANCEAU, J. et al. Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. **EPPO/OEPP Bulletin**, Wageningen, v. 35, n. 1, p. 55-60, April. 2005.
- MANICA, I. Maracujá: Taxonomia – Anatomia – Morfologia. In: **Maracujá: Temas Selecionados – melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia**. SÃO JOSÉ, A.L.; BRUCKNER, C.H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.7-24, 1997.
- MARGIS-PINHEIRO, M. et al. A Defesa das Plantas Contra as Doenças. In: **Ciência Hoje**, São Paulo, v.147, 1999.
- MARTINS, M.C. et al. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2004.
- MARTINS, T.D.; LAVORENTI, N A.; URASHIMA, A.S. Comparação entre métodos de avaliação de transmissão de *Pyricularia grisea* através de sementes de triticales. **Fitopatologia Brasileira**, Comunicações, Brasília, v. 29, n. 4, p. 425-428, 2004.
- MELETTI, L.M.M; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônomo, (Boletim Técnico, 181), 64p, 1999.
- MIRANDA, J.F. **Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 48p, 2004.
- MIZUNO, M. et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, Japan, v. 62, n. 3, p. 434-437, 1998.
- MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2996, 1990.
- MIZUNO, T. et al. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Review International**, Madison, v. 11, p. 7-21, 1995a.
- MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.
- MOREIRA, C.G.A. **Caracterização parcial de frações eliciadoras presentes em extratos de *Cymbopogon nardus***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 89p, 2003.

MOTTA, I.S. **Maracujazeiro em Produção Orgânica e Convencional: cultivares, qualidade da fruta e análise econômica.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 74p. 2005.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Stanford, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NAGAO, E.O. et al. Efeito do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, Viçosa, v. 20, n. 2, Suplemento 2, Julho. 2002.

NAKATANI, A.K. **Diversidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e sensibilidade a produtos químicos.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP. Piracicaba, 61p, 2001.

NAMETH, S.T. Prioridades na pesquisa em patologia de sementes. **Scientia Agrícola**, Botucatu, v. 55, n. 3, p. 403-412, set./dez. 1998.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NOJOSA, G.B.A. Uso de silicatos e fosfitos na indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 123, 2003.

OLIVEIRA, E.C.M. et al. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 169-172, 1999.

OSAKI, Y. et al. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body basidiomycete *Agaricus blazei*. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Japan, v. 114, n. 5, p. 342-350, 1994.

OSSWALD, W.F. et al. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 415-420, 2004.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA, R.O. Shiitake mycelial leachate supresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 1, p. 20-23, 1999.

PAULA, P.D.; TARSITANO, M.A.A.; GRACIOLLI, L A. Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 431-436, 2001.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**, Tese (Livre-docência), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 123p, 1998.

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, p.417-453, 1995.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-52, 1994.

PAZ, I.C.P. et al. Efeito inibitório na germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*) microbiolizadas com um isolado endofítico de *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia, v. 2, n. 1, p. 717-720, 2007.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na Produtividade de Sorgo e na Severidade de Doenças Foliares no Campo **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 160p, 2000.

PICCOLO, G. et al. Efeito alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guaxuma. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 381-386, 2007.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R. de L.R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.525-534, 1997.

PRATES, H.T. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

PRATISSIOLI, D. et al. Fertilizante organomineral e argila silicatada como indutores de resistência à varíola do mamoeiro. **IDESIA**, Chile, v. 25, n. 2, p. 63-67, 2007.

- POLTRONIERI, L. et al. Detecção molecular de *Xylella fastidiosa* em Citros no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Notas Fitopatológicas, Brasília, v. 30, n. 2, p. 199, 2005.
- REIMERS, P.J.; LEACH, J.E. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 39-55, 1991.
- RESENDE, M.L.V. Aspectos moleculares envolvendo o fenômeno da indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 129, 2003.
- RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, E.M. Fisiologia do parasitismo no pós-colheita: mecanismos de defesa do tecido vegetal. In: Simpósio de Controle de Doenças de Plantas: Patologia Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças. Lavras: UFLA/FAEPE. **Anais**, p.113-138, 2002.
- RESENDE, M.L.V. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, 2007.
- ROCHA, M.F.A. et al. Efeito do óleo essencial de alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.) na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, (Supl. 2), 2002.
- RODRIGUES, A.A.C; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- RODRIGUES, E.A. et al. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 213-220, 2006.
- RODRIGUES, E.A. **Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo (*Triticum aestivum*)**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 52p, 2001.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Imprensa Universitária: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 283p, 1995.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Ed. Folha de Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 279p, 2001.

RONCATTO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, vol. 55 n. 3, p. 395-402, 1998.

ROSA, L.H. **Dossiê Técnico: Cultivo do “Cogumelo do Sol”**. Fundação centro Tecnológico de Minas gerais / CETEC, Belo Horizonte, 21p, 2006.

RUANO-ROSA, D. et al. Comparacion of conventional and molecular methods for detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in southern Spain. **Plant Pathology**, London, v. 56, p. 251-256, 2007.

RUGGIERO, C. et al. **Maracujá para Exportação: Aspectos Técnicos da Produção**, MAARA, Secretaria de Desenvolvimento Rural, EMBRAPA, Brasília, 64p, 1996.

RYALS J. et al. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, n. 10. p. 1809-1819, 1996.

SALM, H.; GEIDER, K. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agente of fireblight. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 602-610, 2004.

SANTORUM, M. Efeito alelopático de extrato aquoso de erva-doce [*Foeniculum vulgare* (mill)] sobre germinação de alface, picão- preto e capim colonião. **XVI Semana de Biologia**. Unioeste. Cascavel-PR. 2006.

SANTOS FILHO, H.P.; SANTOS, C.C.F.; CORDEIRO, Z.J.M. Doenças causadas por fungos e bactérias e seu controle. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Frutas do Brasil – Maracujá**. 1 ed. : Embrapa, Brasília, p.76-84, 2002.

SANTOS, D.M. **Efeito do silício na intensidade da cercosporiose *Cercospora coffeicola* (Berk. & Cooke) em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 43 p, 2002.

SASAKI, S.H. et al. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit alagoas serotype of vesicular stomatitis vírus. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 52-55, 2001.

SASAKI, S.H. **Protoplastização de *Lentinula edodes* e seu antagonismo sobre o vírus VSA e sobre fungos filamentosos**. Dissertação (MS). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 69p, 1997.

SAVANT, N.K. et al. Silicon nutrition and sugarcane production: a review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 1853-1903, 1999.

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 112p, 2006.

SCHNEIDER, S.; ULRRICH, W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 20, p. 291-304, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K. R.F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência – plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 124, 2003.

SIEGRIST, L. et al. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 104, p. 599-610, 1997.

SILVA, R. F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 109p, 2007.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SMITH, C.J. Accumulation of Phytoalexins: Defence Mechanism and Stimulus Response System. **New Phytologist**, London, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996.

SMITH, J.A.; HAMMERSCHMIDT, R. Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, p. 255-261, 1988.

SOUSA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivos**. Piracicaba: FEALQ, 179p, 1997.

SOUSA, J.S.I. et al. Comercialização. In: **Frutas do Brasil – Maracujá**. LIMA, A. A. (Ed.). 1 ed. Brasília – DF: Embrapa, p.91-96, 2002.

SOUZA FILHO, A.P.S.; DUARTE, M.L.R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 227-230, 2007.

SOUZA, L.; CRUZ, M.E.S.; CONSTANTIN, J. Efeitos alelopático de espécies vegetais medicinais sobre espécies silvestres e cultivadas. Maringá, II Reunião Anual de Microbiologia agrícola e Plantas Medicinais da UEM. **Resumos**, v.1, 1998.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcimum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1. p. 16-21, 1994.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-279, 1997.

SUGANO, N. et al. Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. **Cancer Letters**, v. 17, n. 2, p. 109-114, 1982.

SUGIYAMA, K. et al. Dietary eritadenine modifies plasma phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed different types of fat. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, p. 593-599, 1997.

SUTHERLAND, M.W. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 79-93, 1991.

SUZUKI, F. et al. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. **Journal Antibiotics**, Japan, v. 32, p. 1336-1345, 1979.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

TODA FRUTA – DOENÇAS DO MARACUJAZEIRO. 2002. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=465. Acesso em 07/03/2007.

TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citros: potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP, Piracicaba, 85p, 2005.

TOKURA L.K., NÓBREGA L.H.P. Potencial alelopático de cultivos de cobertura vegetal no desenvolvimento de plântulas de milho. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 289-295, 2005.

TONUCCI, N.M. **Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e Tobacco mosaic virus (TMV)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP, Piracicaba, 87p, 2004.

TORRES, A. et al. (Editores), Introduction, A Science for the Future, **Proceedings**, In: First World Congress on Allelopathy, Cádiz, Espanha, p.16-20, Setembro. 1996.

URYU, E.N. *Agaricus blazei*: **Cogumelo Medicinal**. Sorocaba: CATI, 25p. (apostila), 1995.

VIGO-SCHULTZ, S.C. et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, out./dez. 2006.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, China, v. 19, n. 1, p. 65-66, 1999.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 428-435, 1999.

XUE, L.; CHAREST, P.M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidases, 1,3-b-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, n. 4, p. 359-365, 1998.

YOUNG, S.A. et al. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 1333-1341, 1995.

ANEXOS

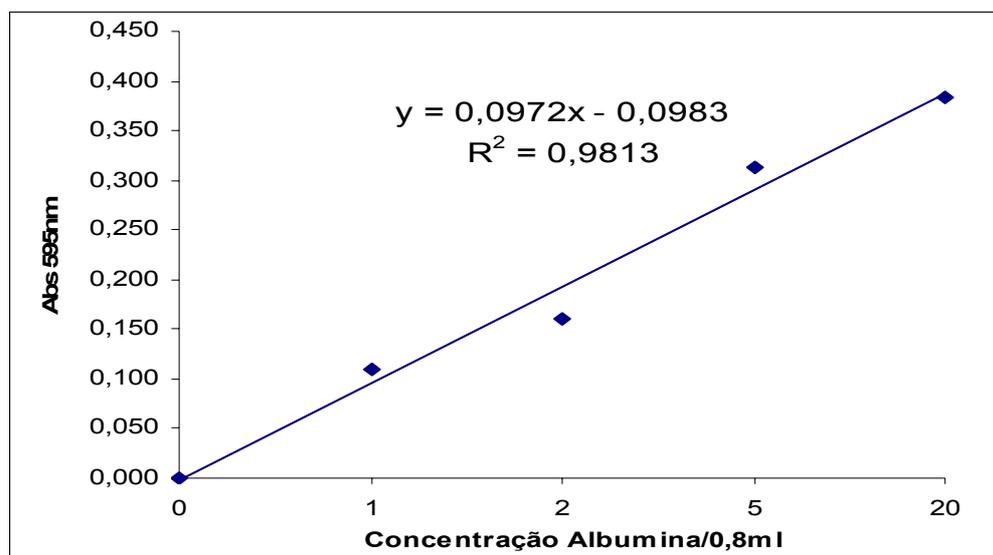


Figura 4. Curva-padrão para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

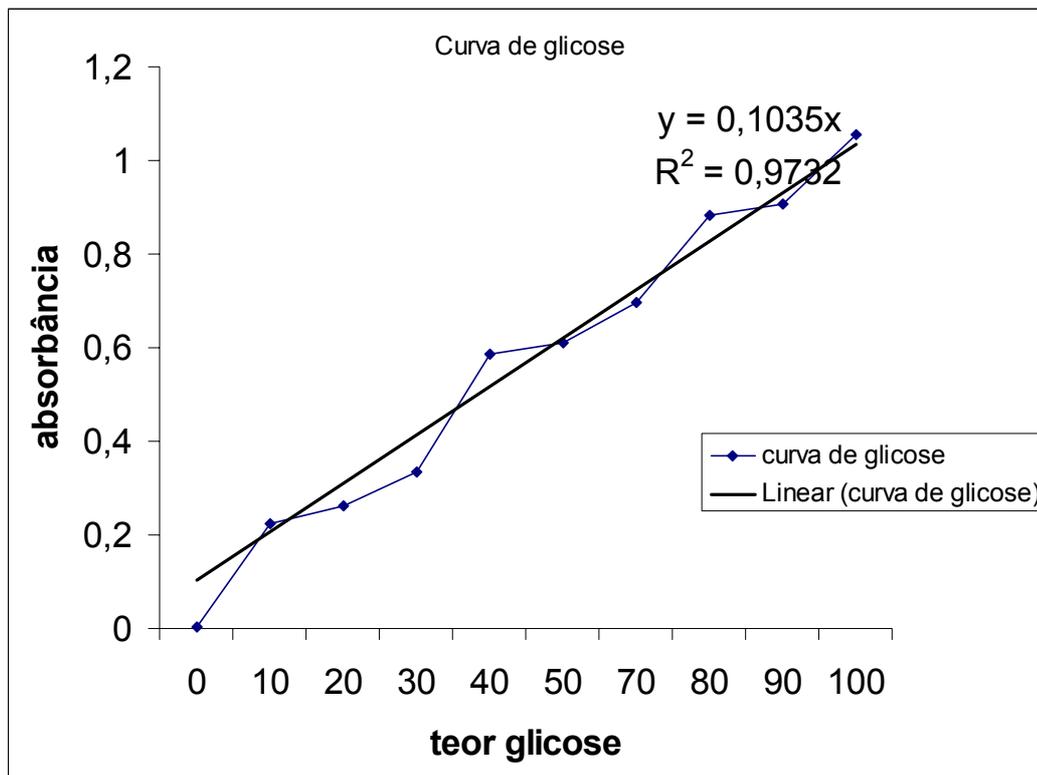


Figura 5. Curva-padrão de glicose para a dosagem de carboidratos redutores por meio do método de Lever. Teor de glicose em µg.

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
LABORATÓRIO DE SOLOS
FONE 44- 3261-4336 FAX 44- 3261- 4732
INTEGRANTE CELA-PR - Comissão Estadual de Laboratórios de Análises Agronômicas do Paraná

INTERESSADO: José Ozinaldo Alves de Sena – Cláudia

Identificação Amostra		pH		cmol _c dm ⁻³							mg dm ⁻³	g dm ⁻³
Laborat.	Produtor	CaCl ₂	H ₂ O	Al ³⁺	H ⁺ + Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	SB	CTC	P	C
1984 P	1 – terra barranco	5,9	6,5	0,0	2,54	2,80	1,60	0,25	4,65	7,19	8,6	3,26
1986 P	3-terra barranco + composto corrigido	6,7	7,0	0,2	2,54	6,46	7,83	0,86	15,15	17,69	896,2	23,61
1987 P	4 – terra barranco corrigida	7,1	7,6	0,0	1,88	3,95	2,61	0,24	6,80	8,68	76,7	3,26

Ca, Mg, Al - extraídos com KCl 1mol L⁻¹ P, K - extraídos com Mehlich 1 H+ Al - método SMP C - método Walkley & Black
SB – Soma de bases

Identificação Amostra		%					Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	$\frac{Ca+Mg}{K}$	$\frac{K}{\sqrt{Ca+Mg}}$
Laborat.	Produtor	V	Ca	Mg	K	m					
1984 P	1 – terra barranco	64,67	38,94	22,25	3,48	0,00	1,75	11,20	6,40	17,60	0,12
1986 P	3-terra barranco + composto corrigido	85,64	36,52	44,26	4,86	1,30	0,83	7,51	9,10	16,62	0,23
1987 P	4 – terra barranco corrigida	78,34	45,51	30,07	2,76	0,00	1,51	16,46	10,88	27,33	0,09

OBS.: Os resultados se referem à(s) amostra(s) analisada(s).

Uma correta interpretação da análise de solo e recomendação de adubação abrange informações do solo, da planta e do manejo adotado. Consulte um profissional engenheiro agrônomo de sua confiança.

Maringá, 26 de outubro de 2006.

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
LABORATÓRIO DE SOLOS
FONE 44- 3261-4336 FAX 44- 3261- 4732
INTEGRANTE CELA-PR (Comissão Estadual de Laboratórios de Análises Agronômicas do Paraná)

INTERESSADO: José Ozinaldo Alves de Sena – Cláudia

Nº Amostra Laborat.	Identificação do Solicitante	mg dm ⁻³			
		Fe	Zn	Cu	Mn
1984 P	1 – terra barranco	151,56	3,08	5,52	49,53
1986 P	3 – terra barranco + composto corrigido	3,73	40,08	1,20	124,32
1987 P	4 – terra barranco corrigida	107,66	10,43	6,43	71,88

- Extraídos com Extrator MEHLICH I

OBS.: Os resultados se referem à(s) amostra(s) analisada(s).

Uma correta interpretação da análise de solo e recomendação de adubação abrange informações do solo, da planta e do manejo adotado. Consulte um profissional engenheiro agrônomo de sua confiança.

Maringá, 26 de outubro de 2006.

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](#)