

INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E ATIVIDADE DE PEROXIDASES EM SORGO E SOJA TRATADOS COM EXTRATOS DE BASIDIOCARPOS DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

C. Peiter-Beninca^{1*}, G. Franzener¹, L. Assi¹, L. Iurkiv¹, B. Eckstein¹,
V.C. Costa¹, M.A. Nogueira¹, J.R. Stangarlin^{1**}, K.R.F. Schwan-Estrada^{2**}

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Fitopatologia, CP 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil. E-mail: camilabeninca@yahoo.com.br

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a indução de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Os extratos diclorometânico, hexânico e etanólico com 100, 250, 500 e 750 mg/L foram testados em relação à indução da produção de fitoalexinas e atividade de peroxidases em cotilédones de soja e mesocótilos estiolados de sorgo. Acibenzolar-S-metil (200 mg/L do produto comercial) e água destilada + Tween 20 foram utilizados como tratamentos controles positivo e negativo, respectivamente. Para fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, o extrato hexânico (750 mg/L) proporcionou a maior indução, porém sem diferir significativamente do ASM. Para fitoalexinas em cotilédones de soja, os extratos de *P. sanguineus* não induziram atividade significativamente diferente dos tratamentos controles positivo e negativo, havendo uma tendência de supressão da síntese de gliceolina pelo extrato diclorometânico. Em relação às peroxidases, os extratos diclorometânico para sorgo e soja e etanólico para soja inibiram a atividade enzimática. A indução verificada para o extrato hexânico em sorgo não diferiu do controle ASM. A atividade específica de peroxidase em soja foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferença do tratamento com ASM. Esses resultados indicam o pequeno potencial destes extratos para a indução de resistência em patossistemas envolvendo sorgo e soja.

PALAVRAS-CHAVE: Indução de resistência, gliceolinas, deoxiantocianidinas.

ABSTRACT

PHYTOALEXIN INDUCTION AND PEROXIDASE ACTIVITY IN SORGHUM AND SOYBEAN TREATED WITH BASIDIOCARP EXTRACTS OF *PYCNOPORUS SANGUINEUS*. This work aimed to verify the phytoalexin induction and the peroxidase activities in sorghum and soybean treated with extracts of *P. sanguineus* basidiocarp. To this end, dichloromethane, hexane and ethanol extracts, in concentrations of 100, 250, 500 and 750 mg/L were tested for phytoalexin induction and peroxidase activity in soybean cotyledons and sorghum etiolated mesocotyls. Acybenzolar-S-methyl (ASM) (200 mg/L of commercial product) and distilled water + Tween 20 (0.5%) were used as positive and negative control treatments, respectively. For the phytoalexin assay in sorghum mesocotyls, the hexanic extract in the concentration 750 mg/L provided the highest induction, however without differing significantly from ASM. For the phytoalexin assay in the soybean cotyledons, *P. sanguineus* extracts did not induce activity significantly different from the positive and negative control treatments, and showed a suppression of glyceollin synthesis for the dichloromethane extract. In relation to peroxidases, the dichloromethane extracts for sorghum and soybean and ethanol extract for soybean inhibited the enzymatic activity. The induction verified for the hexanic extract in sorghum was not different from the ASM control. The specific activity of peroxidase in soybeans was inhibited by the ethanol extract and it was induced by the hexanic, but with no differences in relation to the treatment with ASM. These results indicate the weak potential of these extracts for the induction of resistance in pathosystems involving sorghum and soybeans.

KEY WORDS: Induced resistance, glyceollins, deoxyanthocyanidins.

²Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

*Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

**Bolsistas do CNPq.

INTRODUÇÃO

A indução de resistência corresponde à ativação do sistema de defesa latente nas plantas quando elas entram em contato com agentes chamados de eliciadores ou elicitores (PASCHOLATI; LEITE, 1995; SMITH, 1996). Entre os elicitores estão agentes bióticos, como microrganismos viáveis (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994) ou inativos, ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (HIJWEGWN *et al.*, 1996) e acibenzolar-S-metil, além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI *et al.*, 2005a). Esses mecanismos de resistência podem incluir o acúmulo de compostos fenólicos, de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (como β -1,3 glucanase, quitinase e peroxidase) (CAVALCANTI *et al.*, 2005b).

As fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, sintetizadas e acumuladas nas plantas após estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos (PASCHOLATI; LEITE, 1994; KUC, 1995; HAHN, 1996). Mais de 300 fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos como cumarina, diterpeno e flavonóide, entre outras, e têm sido identificadas em mais de 20 famílias de vegetais (SNYDER; NICHOLSON, 1990). A síntese de fitoalexinas ocorre em inclusões citoplasmáticas próximas ao local da tentativa de penetração do patógeno. Sua ação nos fungos se dá por desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e inibição do crescimento micelial (LO *et al.*, 1996). Em soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (BURDEN; BAILEY, 1975). Em sorgo são produzidos compostos fenólicos em resposta a inoculação com fungos patogênicos ou tratamento com elicitores, sendo identificadas quatro fitoalexinas derivadas de antocianidinas (NICHOLSON *et al.*, 1987; HIPSkind *et al.*, 1990). Bioensaios com cotilédones de soja e com mesocótilos estiolados de sorgo são ferramentas importantes para se testar o efeito elicitor de um tratamento (STANGARLIN *et al.*, 1999).

Além das fitoalexinas, as peroxidases podem atuar na resistência das plantas aos patógenos. As peroxidases participam de vários processos fisiológicos, catalisando a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina, um importante mecanismo físico de defesa vegetal (GASPAR *et al.*, 1982), que contribui no fortalecimento das paredes celulares do hospedeiro. Alterações na atividade de

peroxidases pelo tratamento com elicitores podem indicar o envolvimento destes na indução de resistência em plantas (TENHAKEN *et al.*, 1995).

Entre os elicitores estão os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (compostos secundários) com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (STANGARLIN *et al.*, 1999; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2003; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005), bem como os extratos obtidos de cogumelos (DI PIERO *et al.*, 2005).

PICININ (2000), trabalhando com filtrados aquosos de basidiocarpo, píleo, estipe e micélio do cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake), verificou a ação elicitora desses tratamentos na produção de fitoalexinas do complexo das deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolinas em soja. FIORI-TUTIDA (2003) observou que os extratos aquosos dos cogumelos *L. edodes* e *Agaricus blazei* ('cogumelo do sol') estimularam a produção de fitoalexinas em sorgo e soja, induziram a produção de proteínas relacionadas à patogênese em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de trigo, indicando, assim, que esses cogumelos apresentam potencial como eliciadores de resposta de defesa em plântulas. DI PIERO (2003) constatou em seus experimentos com extratos aquosos de basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei* que houve indução de resistência em plantas de pepino pelos dois cogumelos testados. Em plantas de tomate, apenas *A. blazei* apresentou potencial para o controle da bacteriose causada por *Xanthomonas vesicatoria*.

Outro basidiomiceto com potencial para controle de doenças é o *Pycnoporus sanguineus* ('orelha-de-pau' da família Polyporaceae) (NOBLES; FREW, 1962). A atividade antimicrobiana deste fungo tem sido verificada contra bactérias pela ação de compostos como 'poliporin' (BOSE, 1946) e cinabarina (SMÂNIA JUNIOR *et al.*, 2003).

ASSI (2005) utilizou extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* em ensaios *in vitro* e no cultivo do feijoeiro, concluindo que houve controle do patógeno, tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases. Esses extratos aquosos, entretanto, apresentaram-se inviáveis após 30 dias de armazenamento, mesmo sob refrigeração a 4°C, sendo colonizados por fungos e bactérias saprófitas, além de apresentarem oxidação e precipitação de compostos, havendo a necessidade, portanto, de se obter extratos mais estáveis.

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a indução da produção de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* obtidos com solventes orgânicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de *P. sanguineus* e produção dos extratos

Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná, secos em temperatura constante de 30° C, triturados em moinho de esfera e o pó armazenado em geladeira à 4° C. Uma porção de 160 g do fungo, na forma de pó seco de basidiocarpo, foi submetida à extração (aparelho Soxhlet) com três solventes orgânicos de diferentes polaridades, hexano, etanol e diclorometano, em um procedimento cíclico durante 100h para cada solvente, a 25° C ± 2° C, obtendo os compostos que foram utilizados nos experimentos. As soluções finais foram preparadas em quatro diferentes concentrações: 100, 250, 500 e 750 mg/L em água contendo 0,5% de Tween 20.

Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cv. Brandes foram desinfestadas superficialmente com etanol 50% por 2 min e lavadas em água destilada. Posteriormente, foram enroladas entre folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas no escuro por 3 dias à temperatura de 25° C ± 2° C. Após este período, as plântulas foram mantidas por 4h na luz visando paralisar a elongação dos mesocótilos. Este processo resultou em plântulas com mesocótilos uniformemente alongados e adequados para o ensaio de produção de fitoalexinas (NICHOLSON *et al.*, 1988; YAMAOKA *et al.*, 1990).

Os mesocótilos obtidos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de ensaio para microcentrífuga (quatro mesocótilos/tubo) contendo uma alíquota de 1 mL de cada concentração dos três extratos orgânicos de *P. sanguineus*. Como testemunhas, foram utilizados água destilada esterilizada com 0,5% de Tween 20 e o ativador de defesa vegetal acibenzolar-S-metil (ASM) (200 mg/L do produto comercial) (OSSWALD *et al.*, 2004). Os tubos de ensaio, abertos, foram mantidos em câmara úmida a 25° C sob luz fluorescente (WULFF; PASCHOLATI, 1999). Após 60h, os mesocótilos foram secos e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5cm) (excetuando-se as folhas) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em eppendorfs contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4° C no metanol por 96h para extração dos pigmentos e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 480 nm (NICHOLSON *et al.*, 1987; NICHOLSON *et al.*, 1988). O material vegetal residual desta etapa (folhas) foi enrolado em papel alumínio e congelado em freezer para o teste de peroxidases.

Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Sementes de soja (*Glycine max* L.) cultivar CD 202 (VIGO *et al.*, 2001) foram desinfestadas, colocadas em areia esterilizada (autoclavada) e mantidas em casa de vegetação para germinação. Após 10 dias da semeadura, os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada, enxugados e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Quatro cotilédones foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Foi aplicada sobre cada cotilédone uma alíquota de 40 µL de cada concentração (100, 250, 500 e 750 mg/L) das três soluções do extrato de *P. sanguineus* além dos controles Tween 20 (0,5%) e ASM (200 mg/L do produto comercial Bion®). As placas de Petri foram mantidas à 25° C e escuro. Após 20 h, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada e deixados em agitação por 1 h para extração da fitoalexina formada. A absorbância foi determinada a 285 nm (AYERS *et al.*, 1976; ZIEGLER; PONTZEN, 1982). Após esta etapa os cotilédones foram enrolados em papel alumínio e congelados em freezer a -20° C para o teste de peroxidases.

Atividade de peroxidases

As amostras congeladas remanescentes dos testes de produção de fitoalexinas em sorgo e soja foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato (tampão de extração) 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 6.000 g durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as peroxidases solúveis, foi armazenado a 4° C. A atividade das peroxidases foi determinada a 30° C em espectrofotômetro a 470 nm. A mistura da solução consistiu de 2,9 mL de solução contendo 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 0,1 mL de preparação enzimática (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). Os resultados foram expressos em variação de unidades de absorbância/min/mg de peso fresco ou mg de proteína. O teor de proteínas foi determinado conforme BRADFORD (1976).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

A análise de variância demonstrou significância do teste F, em nível de 5% de probabilidade, para a capacidade de induzir a produção de fitoalexinas em sorgo para os três extratos orgânicos testados. Entre-

tanto, ao realizar o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), pode-se verificar que somente o extrato hexânico a 750 mg/L e o extrato etanólico a 100 mg/L de *P. sanguineus* tiveram atividade eliciadora efetiva, proporcionando valores de absorvância estatisticamente superiores ao da testemunha água (Tabela 1). Entretanto, esses valores foram 39 e 78%, respectivamente, inferiores que o obtido para o ASM (testemunha positiva). Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre suas médias, porém diferiram da testemunha ASM, sendo verificados valores inferiores a esta.

As análises de regressão dos tratamentos indicaram ajustes lineares crescentes ($y = 0,203x + 0,1213$) e ($y = 0,0032x + 0,3077$) para os extratos diclorometânico e etanólico, respectivamente, enquanto que para o extrato hexânico o ajuste foi para uma equação de segundo grau, com incremento na indução de fitoalexinas diretamente proporcional às concentrações do extrato.

Para outros basidiomicetos também se tem verificado a capacidade de indução de fitoalexinas. FIORI-TUTIDA (2003) observou que os extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* possuem atividade eliciadora de fitoalexinas (deoxiantocianidinas) em mesocótilos de sorgo. Para *P. sanguineus*, no entanto, não há na literatura nenhum relato sobre o potencial indutor de fitoalexinas em sorgo.

Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja

Pela análise de variância, em nível de 5% de probabilidade, não se observaram diferenças significativas no teste F (tratamentos entre si e com as testemunhas) em todos os extratos orgânicos testados para a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja (Tabela 2).

Para o extrato diclorometânico observou-se uma curva de regressão com R^2 de 0,67 e o melhor ajuste dos dados procedeu-se com uma equação de segundo grau. Não houve ajuste satisfatório dos dados para os extratos hexânico e etanólico.

Pode-se concluir que a média da produção de fitoalexinas foi maior em mesocótilos estiolados de sorgo (0,44 de absorvância/g.p.f.) do que em cotilédones de soja (0,031 de absorvância/g.p.f.). Essa comparação está de acordo com os resultados de PICCININ (2000) que, utilizando diferentes extratos de *L. edodes*, constatou maior acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo do que em cotilédones de soja.

FIORI-TUTIDA (2003) observou resultados diferentes deste trabalho, verificando que os extratos aquosos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* possuem atividade eliciadora de fitoalexinas em cotilédones de soja, visto que há indução de gliceolina em soja pelos polissacarídeos presentes em extratos aquosos. Há

evidências de receptores em soja que se ligam a glucanas acarretando a indução de fitoalexinas. O gênero *Agaricus* proporcionou um maior acúmulo de fitoalexinas gliceolinas (0,41 de absorvância/g.p.f.) do que o gênero *Lentinula* (0,16 de absorvância/g.p.f.). Já para mesocótilos de sorgo, o gênero *Lentinula* proporcionou maior acúmulo de fitoalexinas do que *Agaricus*.

Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo

Pode-se observar que para o extrato diclorometânico houve uma supressão da atividade de peroxidases a partir da concentração de 100 mg/L. A curva de regressão obteve um R^2 relativamente baixo (0,53) e a equação que melhor explicou os dados foi a de 2º grau. Pode-se concluir pelo teste F (5% de probabilidade) que os dados não diferiram significativamente entre si e também não diferiram da testemunha (Tabela 3). Este extrato apresentou, na média, a menor atividade de peroxidases (1,96 absorvância/min/g.p.f.), em comparação aos outros dois extratos.

Com relação ao extrato hexânico, a maior atividade de peroxidases foi com concentração de 250 mg/L (2,98 absorvância/min/g.p.f.), mas sem diferença significativa da testemunha, que foi de 2,74 absorvância/min/g.p.f., e dos outros extratos. O melhor ajuste dos dados foi com uma equação de 2º grau.

O extrato etanólico revelou uma diminuição na atividade de peroxidases conforme aumentou sua concentração, não havendo um ajuste satisfatório dos dados, já que o valor do R^2 foi baixo. A produção média de peroxidases foi de 2,1 absorvância/min/g.p.f.

Atividade de peroxidases em cotilédones de soja

Para o extrato diclorometânico, verificou-se a maior atividade de peroxidases (5,16 absorvância/min/g.p.f.) na concentração de 100 mg/L de *P. sanguineus*, superando a testemunha ASM em 30%. O ponto de mínima atividade foi em 500 mg/L, com 3,38 de absorvância/min/g.p.f. Contudo, ao realizar a análise de variância, pode-se verificar que o teste F não acusou significância ao nível de 5% de probabilidade, para os dados entre si e com a testemunha (Tabela 4). O melhor ajuste da curva foi realizado com uma equação de 2º grau. Para o extrato hexânico, não houve ajuste satisfatório dos dados.

Os dados do extrato etanólico indicam uma supressão da atividade de peroxidases proporcional ao aumento da concentração utilizada. O melhor ajuste dos dados foi com a equação de 2º grau. Novamente, a análise de variância não demonstrou significância pelo teste F entre os tratamentos e a testemunha.

Tabela 1 - Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento com extratos de *P. sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.

Extratos	Concentrações (mg/L)				
	0	100	250	500	750
Hexano	0,14*a	0,42b ⁻	0,29a ⁻	0,51a ⁻	1,78a ^{ns}
Etanol	0,14a	0,61a ^{ns}	0,17a ⁻	0,27a ⁻	0,29b ⁻
Diclorometano	0,14a	0,17b ⁻	0,14a ⁻	0,29a ⁻	0,28b ⁻
ASM**	2,91				

*Valores representam a absorvância (480 nm)/grama de peso fresco;

**Acibenzolar-S-metil (200 mg do produto comercial/L); Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

(⁺) e (⁻): diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

Tabela 3 - Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento com extratos de *P. sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.

Extratos	Concentrações (mg/L)				
	0	100	250	500	750
Hexano	2,58*a	2,51a ^{ns}	2,98a ^{ns}	2,76a ^{ns}	2,84a ^{ns}
Etanol	2,58a	2,21a ^{ns}	1,94ab ^{ns}	2,18a ^{ns}	1,99a ^{ns}
Diclorometano	2,58a	2,28a ^{ns}	1,56b ⁻	1,91a ^{ns}	1,80a ^{ns}
ASM**	2,74				

*Valores representam a variação nas unidades de absorvância (470 nm)/min/grama peso fresco;

**Acibenzolar-S-metil (200 mg do produto comercial/L); Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

(⁺) e (⁻): diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

Em relação ao experimento com atividade de peroxidases, pode-se concluir que houve maior indução pelos extratos de *P. sanguineus* em cotilédones de soja do que em mesocótilos de sorgo. O valor mínimo de atividade de peroxidases em cotilédones de soja foi 100% maior do que o valor mínimo produzido em mesocótilos de sorgo.

Assi (2005), em trabalho com feijoeiro tratado com extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, concluiu que houve ativação de mecanismos de defesa, principalmente para extrato em concentração de

Tabela 2 - Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja pelo tratamento com extratos de *P. sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.

Extratos	Concentrações (mg/L)				
	0	100	250	500	750
Hexano	0,031*a	0,032 ^{ns}	0,025 ^{ns}	0,030 ^{ns}	0,032 ^{ns}
Etanol	0,031a	0,023 ^{ns}	0,035 ^{ns}	0,27a ⁻	0,026 ^{ns}
Diclorometano	0,031a	0,031 ^{ns}	0,037 ^{ns}	0,29a ⁻	0,025 ^{ns}
ASM**	0,031				

*Valores representam a absorvância (285 nm)/grama de peso fresco;

**Acibenzolar-S-metil (200 mg do produto comercial/L); Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%).

Tabela 4 - Atividade de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento com extratos de *P. sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.

Extratos	Concentrações (mg/L)				
	0	100	250	500	750
Hexano	2,58*a	3,96a ^{ns}	3,10a ^{ns}	3,68a ^{ns}	3,27a ^{ns}
Etanol	2,58a	4,49a ^{ns}	4,21a ^{ns}	3,73a ^{ns}	3,80a ^{ns}
Diclorometano	2,58a	5,16a ^{ns}	3,91a ^{ns}	3,38a ^{ns}	4,33a ^{ns}
ASM**	3,95				

*Valores representam a variação das unidades de absorvância (470 nm)/min/grama peso fresco;

**Acibenzolar-S-metil (200 mg do produto comercial/L); Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%).

20%, através de incremento local e sistêmico na atividade e atividade específica de peroxidases, o que pode ter contribuído para a redução da severidade da antracnose causada por *C. lindemuthianum*.

Com relação a atividade específica de peroxidase em cotilédones de soja, pode-se observar com o extrato diclorometânico o maior valor (na concentração de 250 mg/L) superando a testemunha ASM em 30% (Tabela 5). Para o extrato hexânico houve incremento na atividade de peroxidases, com ajuste para equação de 2º grau e pico de atividade na concentração de 500 mg/L.

Tabela 5 - Atividade específica de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento com extratos de *P. sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.

Extratos	Concentrações (mg/L)				
	0	100	250	500	750
Hexano	2,08 ^a	1,35 ^b	1,13 ^{a^{ns}}	2,48 ^{a^{ns}}	2,10 ^{a^{ns}}
Etanol	2,08 ^a	2,06 ^{ab^{ns}}	1,29 ^{a^{ns}}	0,30 ^b	0,23 ^b
Diclorometano	2,08 ^a	2,45 ^{a^{ns}}	2,68 ^{a^{ns}}	2,34 ^{a^{ns}}	2,54 ^{a^{ns}}
ASM**	2,07				

*Valores representam a variação das unidades de absorvância (470 nm)/ min/ µg de proteína;

**Acibenzolar-S-metil (200 mg do produto comercial/L); Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

^(ns): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

^{(*) e ^(†)}: diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

O tratamento com extrato etanólico demonstrou uma inibição da atividade de peroxidase proporcional ao aumento da concentração utilizada. Os dados se ajustaram a uma equação de 2º grau. Para as concentrações de 500 e 750 mg/L a atividade específica foi significativamente inferior à obtida no tratamento com ASM. O teste de Tukey ($P \leq 0,05$) das concentrações 500 e 750 mg/L demonstrou que os extratos hexânico e diclorometânico não diferiram para a testemunha ASM, porém diferiram estatisticamente do extrato com etanol, com valores até nove vezes maior para estas concentrações.

Apesar da enzima peroxidase estar relacionada a eventos envolvendo a indução de resistência (CAVALCANTI *et al.*, 2005b), não há um padrão definido para seu comportamento, o qual depende do tipo de indutor ou eliciador, sua concentração, tempo após a sua aplicação na planta e patossistema em estudo.

VIECELLI (2008) também observou redução na atividade de peroxidase em feijoeiro (IAPAR 81 Carioca) tratado com extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 10% e inoculado com *Pseudocercospora griseola* (sin.: *Phaeoisariopsis griseola*), patógeno causador da Mancha Angular. O mesmo extrato, na concentração de 20%, incrementou a atividade de peroxidase aos quatro dias após a inoculação (DAI), mas a reduziu aos cinco e sete DAI. Para o extrato aquoso de micélio de *P. sanguineus* e filtrado de cultura desse basidiomiceto, esse autor também verificou indução de atividade de peroxidase aos quatro DAI, com posterior redução aos cinco e sete DAI. Tal comportamento foi observado tanto na terceira folha de feijoeiro, que foi tratada e posteriormente inoculada

com o patógeno, quanto na quarta folha apenas inoculada, demonstrando a sistemicidade desse efeito.

Esse comportamento oscilante na atividade de peroxidase também foi observado por BALDO (2008) utilizando esses mesmo extratos aquosos em feijoeiro (IAPAR 81 Carioca) inoculado com *C.lindemuthianum*.

Para os extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, esse comportamento oscilatório de indução e repressão da atividade de peroxidase pode estar relacionado à quantidade de compostos eliciadores presentes nele. JURKIV *et al.* (2008), trabalhando com cinco picos protéicos e um pico de carboidrato, obtidos por cromatografia de filtração em gel a partir de extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 20% (peso seco/volume), observaram que esses picos isoladamente proporcionaram incrementos de até 47% na atividade de peroxidase em cotilédones de soja, enquanto que o extrato não fracionado apresentou característica supressora para esta enzima, com redução de 62% para sua atividade específica.

CONCLUSÕES

Os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *P. sanguineus* não possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja, mas induzem a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Os extratos orgânicos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, diclorometânico para sorgo e soja e etanólico para soja inibem a atividade de peroxidase, enquanto que o extrato hexânico incrementa a atividade e a atividade específica para sorgo e soja, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ASSI, L. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.). 2005. 51p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, 2005.
- AYERS, A.R.; EBEL, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*, v.57, p.751-759, 1976.

- BALDO, M. *Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de Pycnoporus sanguineus*. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, 2008.
- BOSE, S.R. Antibiotics in a Polyporus (*Polystictus sanguineus*). *Nature*, v.158, p.292-296, 1946.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BURDEN, R.J.; BAILEY, J.A. Structure of the phytoalexin from soybean. *Phytochemistry*, v.14, p.1389-1390, 1975.
- CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005a. 263p.
- 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. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005b. p.81-124.
- COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.). *Modern fungicides and antifungal compounds*. Andover: Intercept, 1996. p.461-466.
- DI PIERO, R.M. *Potencial dos cogumelos Lentinula edodes (Shiitake) e Agaricus blazei (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos*. 2003. 157p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- DI PIERO, R.M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.29-50.
- FIORI-TUTIDA, A.C.G. *Uso de extratos dos Cogumelos Lentinula edodes (Berk.) Pegler e Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinem no controle in vitro de Puccinia recondita f. sp. tritici e na indução de resistência em trigo à Bipolaris sorokiniana*. 2003. 112p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. *Peroxidases 1970-1980: a survey of their biotecnical and physiological roles in higher plants*. Geneva: Universidade de Geneva, Centro de Botanique, 1982. 324p.
- HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, n.34, p.387-412, 1996.
- HIJWEGWN, T.; VERHAAR, M.A.; ZADORKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathology*, v.45, p.631-635, 1996.
- HIPSKIND, J.; HANAU, R.; LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.36, p.381-396, 1990.
- IURKIV, L.; BALDO, M.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; KUHN, O.J.; MEINERZ, C.C. Atividade de peroxidases em cotilédones de soja tratados com frações de *Pycnoporus sanguineus* obtidas a partir de cromatografia de filtração em gel (CFG). *Summa Phytopathologica*, v.34, p.91-92, 2008.
- KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.33, p.275-297, 1995.
- LO, S.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.49, n.1, p.21-31, 1996.
- 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*, v.25, p.244-249, 1999.
- NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.84, p.5520-5524, 1987.
- NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.33, p.271-278, 1988.
- NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. *Canadian Journal of Botany*, v.40, p.987-1016, 1962.
- OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of Acibenzolar-S-methyl on phytoalexins and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. *Summa Phytopathologica*, v.30, n.4, p.415-420, 2004.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.2, p.1-51, 1994.

- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência, 1995. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). *Manual de fitopatologia-princípios e conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-454.
- PICCININ, E. *Potencial de preparações do cogumelo comestível "shiitake" (Lentinula edodes) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo*. 2000. 160p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v.8, p. S54-S56, 2003.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.125-138.
- SMÂNIA JUNIOR, A.; MARQUES, C.J.S.; SMÂNIA, E.F.A.; ZANETTI, C.R.; CAROBREZ, S.G.; TRAMONTE, R.; LEITE, C.L. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, n.17, p.1069-1072, 2003.
- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist*, v.132, n.1, p.1-45, 1996.
- SNYDER, B.; NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site response to fungal ingress. *Science*, v.248, p.1637-1639, 1990.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phythopatologica*, v.20, p.16-21, 1994.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Medicinais - Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biocologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.11, p.16-21, 1999.
- TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.92, p.4158-4163, 1995.
- VIECELLI, C.A. *Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de Pycnoporus sanguineus*. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, 2008.
- VIGO, S.C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Indução de gliceolina em soja e inibição da germinação de conídios de *Microsphaera diffusa* pela tritura vegetal de *Puffia glomerata*. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.351, 2001. Suplemento.
- WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, n.3, p.428-435, 1999.
- YAMAOKA, N.; LYONS, P.C.; HIPSKIND, J.; NICHOLSON, R.L. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.37, p.255-270, 1990.
- ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology*, v.20, p.321-331, 1982.

Recebido em 16/5/07

Aceito em 21/8/08