

CONTROLE DE CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM (*XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI*) E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM FEIJOEIRO INDUZIDAS POR *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

S.L. Toillier¹, L. Iurkiv¹, C.C. Meinerz¹, M. Baldo¹, C.A. Viecelli¹,
O.J. Kuhn², K.R.F. Schwan-Estrada³, J.R. Stangarlin¹

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

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar as atividades antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *Pycnopus sanguineus* para controle do crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em feijoeiro. *In vitro* foram utilizados extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20%, além das testemunhas água, acibenzolar-S-metil (ASM - 125 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). *In vivo* foram realizadas avaliações de severidade e atividade de peroxidase, polifenoloxidase, β-1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase, com o uso de extrato aquoso de micélio e de basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus* a 5% e 10%. Verificou-se atividade antibacteriana apenas para o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo nas concentrações de 1 a 20%. *In vivo*, os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, com redução média de 56% na severidade, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência, envolvendo principalmente a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase e polifenoloxidase.

PALAVRAS-CHAVE: Controle alternativo, indução de resistência, proteínas relacionadas à patogênese, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

CONTROL OF BACTERIAL BLIGHT (*XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI*) AND BIOCHEMICAL ANALYSES OF BEAN RESISTANCE TREATED WITH *PYCNOPORUS SANGUINEUS* EXTRACTS. The aim of this work was to verify the antimicrobial and resistance induction activities of *Pycnopus sanguineus* extracts for the control of common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *In vitro* assays were performed using aqueous extracts from basidiocarp, mycelium and culture filtrate of *P. sanguineus* in concentrations of 1, 5, 10, 15 and 20%, with water, acibenzolar-S-methyl (ASM - 125 mg a.i. L⁻¹) and antibiotic (oxytetracycline 22.5 mg L⁻¹ + streptomycin 225 mg L⁻¹) as control treatments. For the *in vivo* assays the disease severity and the activities of peroxidase, polyphenol oxidase, β-1,3 glucanase and phenylalanine ammonia-lyase were evaluated using extracts of mycelium, basidiocarp and culture filtrate of *P. sanguineus* at 5% and 10%. Antibacterial activity was verified only for culture filtrate in concentrations above 15% and for concentrations of 1% to 20% of basidiocarp extract. The results of the *in vivo* assays indicated the potential of basidiocarps extracts from *P. sanguineus* for the control of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* in beans, with an average severity reduction of 56%, which may have been due either to direct antimicrobial activity or to resistance induction involving mainly the activation of the plant defense enzymes peroxidase and polyphenol oxidase.

KEY WORDS: Alternative control, resistance induction, pathogenesis related proteins, antimicrobial activity.

²Universidade Federal do Pampa, Itaqui, RS, Brasil.

³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Maringá, PR, Brasil.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser afetado por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides, as quais contribuem para o seu baixo rendimento, em todas as regiões do mundo onde é cultivado (BIANCHINI *et al.*, 2005). Os danos são observados desde a semeadura até quando os grãos estão secos nas vagens. Muitas dessas doenças podem causar, de acordo com as condições do ambiente, danos totais na produção ou, dependendo do nível de contaminação, tornar inviáveis determinadas áreas para o cultivo.

Dentre as doenças de origem bacteriana que afetam a cultura do feijoeiro, o crestamento comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* é a que apresenta maior importância (SARTORATO *et al.*, 1996), devido à capacidade de reduzir a produção de forma significativa e às dificuldades de controle (VALE *et al.*, 1997). Dessa forma, é necessário desenvolver novos métodos de controle para tal doença, como a indução de resistência em plantas usando produtos naturais (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes eliciadores os quais são moléculas capazes de ativar mecanismos de defesa na planta, protegendo-a contra infecções subsequentes por patógenos (STANGARLIN *et al.*, 1999). Entre os eliciadores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (STANGARLIN *et al.*, 2008), bem como os extratos obtidos de cogumelos (DI PIERO *et al.*, 2005).

Entre os basidiomicetos com propriedades eliciadores destaca-se *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., utilizado desde a medicina popular (SMÂNIA *et al.*, 1995) até ao controle alternativo de doenças de plantas (PEITER-BENINCA *et al.*, 2008; IURKIV, 2009), com potencial para a indução de resistência, tornando-se promissor em pesquisas relacionadas.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivos investigar o uso de extratos aquosos de basidiocarpo, micélio ou filtrado de cultura de *P. sanguineus* para controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, por meio de avaliações da atividade antimicrobiana *in vitro* contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e da indução de resistência pela ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Paraná –

UNIOESTE - Campus de Marechal Cândido Rondon, PR. Para os ensaios de indução de resistência, plantas de feijoeiro cultivar Carioca IAPAR 81 foram cultivadas em vasos plásticos (com capacidade para 1,5 L) contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1) e mantidas em cultivo protegido (ASSI, 2005). Foram utilizadas duas plantas por vaso. A bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi isolada de folhas sintomáticas provenientes de cultivos comerciais de feijoeiro do Município de Marechal Cândido Rondon, PR.

Obtenção do filtrado de cultura e dos extratos aquosos de *P. sanguineus*

Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná e, posteriormente, secos em temperatura constante de 30°C para serem moídos em moinho de facas. O preparo de extratos aquosos de basidiocarpo constituiu na hidratação do pó seco de basidiocarpos por 24h à temperatura de 4°C (mantidos em geladeira), na proporção de 14 mL de água destilada para 1 g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel filtro Whatman n° 1 (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004). Os filtrados coletados foram esterilizados por filtração em membrana com 0,45 μ m de diâmetro de poro, em câmara de fluxo laminar. Esses filtrados armazenados em geladeira a 4°C foram utilizados após diluições para obter as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20% para os testes *in vitro* e nas concentrações de 5 e 10% para os ensaios de proteção de plantas (ASSI, 2005).

Para obtenção do micélio de *P. sanguineus*, foram preparados 100 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose), nos quais foram repicados cinco discos contendo meio de cultura mais micélio de *P. sanguineus*, crescido por 14 dias em meio BDA e em escuro a 25°C, sob agitação (150 rpm). Após vinte dias, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel filtro Whatman n° 1. O material que passou pelo filtro foi considerado o filtrado de cultura, sendo utilizado nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20% para os testes *in vitro* e nas concentrações de 5 e 10% para os ensaios de proteção de plantas. O micélio retido no filtro foi colocado em estufa a 40°C até obtenção de peso constante e, posteriormente, macerado em almofariz de porcelana para obtenção do pó. Esse pó de micélio foi hidratado em água destilada na proporção definida anteriormente, constituindo assim o extrato aquoso de micélio e utilizado nos testes *in vitro* e de proteção de plantas.

Atividade antibacteriana

Para esse ensaio foi preparado meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne: 3 g; peptona: 5 g; glicose: 15 g; água destilada: 1.000 mL) (MARIANO;

SILVEIRA, 2000). O meio esterilizado (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do filtrado e dos extratos de *P. sanguineus* (1, 5, 10, 15 e 20%), esterilizados por filtração. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28°C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Apenas o meio de cultura foi utilizado como tratamento controle.

Indução de resistência

Foi realizado o ensaio com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com os seguintes tratamentos: (a) testemunha ou controle negativo: plantas tratadas com água destilada; (b) controle positivo n° 1: bactericida sistêmico – Agrimicina (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina); (c) controle positivo n° 2: indutor de resistência – acibenzolar-S-metil (125 mg i.a. L⁻¹); (d) extrato de basidiocarpos, (e) de micélio e (f) filtrado de cultura de *P. sanguineus*, em concentrações de 5 e 10%.

Os tratamentos, em quantidade de 3 mL, foram aplicados na primeira folha trifoliada três dias antes da inoculação do patógeno. A inoculação foi realizada na primeira folha trifoliada tratada, bem como na segunda folha trifoliada não tratada, para se observar a ocorrência de proteção local e/ou sistêmica, respectivamente. As inoculações foram realizadas na parte da manhã, mediante aspersão de suspensão de inóculo contendo 5 X 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA; SARTORATO, 1994). Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polipropileno com água destilada aspergida para simular câmara úmida por 24h (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2000). Após esse período, a câmara úmida foi removida e as plantas ficaram em casa de vegetação climatizada a 28°C. A avaliação da severidade foi realizada 12 dias após os tratamentos, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE *et al.*, 2003).

Coleta de amostras para análises bioquímicas

Foram coletados três quadrados (1 cm²) de folha por amostra no momento dos tratamentos e também nos 3°, 6°, 9° e 12° dias após. Durante o procedimento, cada amostra coletada foi imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20°C. Coletaram-se amostras nas 1^{as} folhas trifoliadas inoculadas, bem como nas 2^{as} folhas trifoliadas não-inoculadas.

Obtenção dos extratos proteicos

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

Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C, através de método espectrofotométrico direto a 470 nm, utilizando guaiacol e peróxido de hidrogênio como substrato (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A atividade específica de peroxidase foi expressa em absorbância min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com a metodologia de DUANGMAL; APENTEN (1999), mensurando-se a oxidação do catecol convertido em quinona. Os resultados foram expressos em absorbância min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada a 37°C por espectrofotometria direta medida pela conversão de L-fenilalanina em ácido transcinâmico a 290 nm (STANGARLIN *et al.*, 2005). Os resultados foram expressos em mg de ácido transcinâmico h⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Atividade de β-1,3 glucanase

A atividade da β-1,3 glucanase foi avaliada segundo metodologia descrita por STANGARLIN *et al.* (2005). A reação foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e os resultados expressos em µg de glicose min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Teor de proteína

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de BRADFORD (1976). A concentração de proteínas, expressa em termos equivalentes de µg de albumina de sorobovino (ASB) em 1 mL de amostra (µg proteína

mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de *P. sanguineus* sobre o crescimento bacteriano de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* indicou que o extrato de micélio (Fig. 1A) estimulou o crescimento da bactéria de forma dose-dependente. O filtrado a 20% reduziu em 21% o crescimento bacteriano quando comparado àquele em meio de cultura na ausência dos tratamentos (indicado no gráfico como concentração zero) (Fig. 1B). Os extratos de basidiocarpo em 15% e 20% reduziram 91% em média o crescimento bacteriano, comportando-se estatisticamente igual ao antibiótico, que reduziu o crescimento em 81% (Fig. 1C). O acibenzolar-S-metil (ASM) não apresentou atividade antibiótica.

Na literatura não há relatos sobre a ação antimicrobiana de extratos de *P. sanguineus* contra bactérias fitopatogênicas, mas apenas para fungos. Para BALDO (2008), a análise dos dados do ensaio *in vitro* da germinação de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum* revelou que os extratos aquosos de basidiocarpo de *P. sanguineus* tiveram efeito inibitório na germinação em até 97%. Semelhantemente, ASSI (2005) observou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* reduziram em até 96% a germinação *in vitro* de esporos de *C. lindemuthianum*.

VIECELLI *et al.* (2008) puderam verificar, no ensaio de germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola*, que extratos de micélio de *P. sanguineus*, a partir da concentração 5%, inibiram significativamente a germinação, enquanto extratos de basidiocarpos e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* não apresentaram efeito significativo.

BALDO *et al.* (2008) observaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações 5, 10, 15 e 20% inibiram significativamente a germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus* e de *Phakopsora euvitis* em até 79% e 73%, respectivamente, em relação à testemunha água.

Avaliação da severidade

Tanto para a primeira folha tratada e inoculada (Fig. 2A) quanto para a segunda folha apenas inoculada (Fig. 2B), a severidade foi menor nas plantas que receberam filtrado de cultura de *P. sanguineus* a 5 e 10%. Na 1ª folha tratada com o filtrado de cultura a 5%, a redução da doença, quando comparado à água, foi de 33,44% e com o uso do filtrado de cultura a 10% foi

de 21,73%, ao passo que na 2ª folha, tanto o tratamento com filtrado a 5% quanto a 10%, reduziram em quase 90% a severidade, quando comparados com a testemunha água. Resultados semelhantes foram observados nos tratamentos com extratos de basidiocarpo e de micélio e com antibiótico. Isso indica que os tratamentos à base de *P. sanguineus* podem ter induzido tanto resistência local quanto sistêmica em feijoeiro ao crestamento bacteriano. Na literatura não há relatos do uso de indutores dessa natureza para controle desta doença em feijoeiro.

Atividade de enzimas de defesa vegetal

Peroxidase

As plantas de feijão que receberam extratos de basidiocarpo e de micélio e filtrado de cultura na 1ª folha, tratada e inoculada, bem como na 2ª folha, não tratada e inoculada, apresentaram oscilação no incremento da atividade de peroxidase quando comparados às testemunhas água, antibiótico e ASM (Fig. 3).

Para o extrato de basidiocarpo a 10% na 1ª folha, observou-se incremento da atividade de peroxidase aos 6 DAT, diminuindo sua expressão no 9º DAT, voltando novamente ao mesmo patamar de expressão observado no 6º DAT para o 12º DAT, quando comparado às testemunhas e aos demais tratamentos, sendo superior ao ASM em 90% no 6º DAT e à testemunha água em 135% no 12º DAT. O micélio a 10% foi superior em 200% à testemunha água ao 6º DAT, e o filtrado de cultura a 5% apresentou incrementos na atividade da peroxidase de forma mais expressiva no 6º DAT, sendo 165% superior à testemunha água.

No momento da inoculação do patógeno (3º DAT), a maior atividade específica da peroxidase na 2ª folha foi observada no tratamento com filtrado a 5 e 10%, sendo que o primeiro foi 76% superior à testemunha água e o segundo 65%. O extrato de basidiocarpo a 5% e o filtrado a 10% apresentaram maior atividade ao 6º DAT, com o primeiro sendo superior à testemunha água em mais de 300% e o segundo em 65%.

BALDO *et al.* (2008) observaram incremento na atividade da peroxidase em função dos tratamentos com extrato de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* em feijoeiro, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito em função dos tratamentos, resultado esse também encontrado por VIECELLI (2008).

Para MEINERZ *et al.* (2007), o extrato bruto de basidiocarpo de *P. sanguineus*, na concentração de 5%, promoveu incremento na atividade de peroxidase de 41% em cotilédones de soja, ao passo que o ASM promoveu resultados semelhantes à testemunha água. Já IURKIV (2009) pôde observar que a aplicação de extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 20%

apresentou característica supressora da atividade de peroxidase em cotilédones de soja, proporcionando redução de 61,6% na atividade em relação a testemunha água.

PEITER-BENINCA *et al.* (2008), avaliando a indução de peroxidases, verificaram que os extratos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *P. sanguineus*, em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja, inibiram a atividade enzimática. A indução verificada para o extrato hexânico em sorgo não diferiu do controle ASM, e em soja a atividade foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferir do tratamento com ASM.

Polifenoloxidase

A maior atividade específica de polifenoloxidase na 1ª folha foi com o EA de basidiocarpo a 5% aos 12 DAT, ao passo que na 2ª folha, sua maior atividade foi a 10% no 9º DAT. Comparando-se os tratamentos em ambas as folhas, o extrato de basidiocarpo a 5% foi superior ao ASM em 1000%, e o basidiocarpo a 10% foi superior em 500% à testemunha água (Fig. 4). O filtrado a 10% na 1ª folha, aos 9 DAT, foi superior à testemunha água em 150%. O micélio a 10% na 1ª folha, quando comparado à testemunha água aos 12 DAT, foi superior em 44%. Para o micélio a 5%, no momento da inoculação do patógeno (3º DAT) na 2ª folha, a atividade apresentou-se de forma acentuada, sendo superior à água em 240%, com estabilização da expressão no decorrer dos dias.

Estes resultados são semelhantes aos de VIECELLI (2008), que verificou que a atividade dessa enzima foi influenciada pelos tratamentos com extratos de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito indutor.

Dependendo da combinação elicitor – planta hospedeira, a resposta para polifenoloxidase pode ser diferente da encontrada neste trabalho. Em soja, MEINERZ *et al.* (2007) verificaram decréscimo da atividade dessa enzima em função do aumento da concentração do extrato de basidiocarpo de *P. sanguineus*. KUHN (2007) observou que a atividade específica de polifenoloxidase em feijoeiro não foi alterada em função dos indutores *Bacillus cereus* e ASM.

Fenilalanina amônia-liase

A atividade específica de fenilalanina amônia-liase pouco incrementou no decorrer dos dias em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*, local (1ª folha, tratada e inoculada) e sistemicamente (2ª folha, apenas inoculada) (Fig. 5). Na 1ª folha, todos os tratamentos, comparados às testemunhas, tiveram comportamento semelhante, verificando aqui que a indução de

resistência não foi ativada em função dos tratamentos, mas sim, em função do patógeno desafiador aplicado. Pode-se observar apenas que o extrato de micélio a 10% proporcionou incremento na atividade da FAL em 460% quando comparado à testemunha água.

Na 2ª folha, a maior expressão da enzima ocorreu aos 9 DAT no tratamento com o extrato de basidiocarpo a 10%, superior à testemunha água em mais de 1000%. De modo geral, a análise estatística indica que não houve incrementos significativos na atividade específica da FAL com a utilização dos extratos de *P. sanguineus*. O mesmo pôde ser observado por KUHN (2007) em feijoeiros tratados com *B. cereus* e ASM. Segundo o autor, isto pode significar que toda a rota dos fenilpropanoides não sofreu alterações como, por exemplo, os mecanismos de síntese de lignina, compostos fenólicos e quinonas, entre outros.

β -1,3 glucanase

Assim como para FAL, a atividade específica de β -1,3 glucanase teve pouco incremento no decorrer dos dias em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*, local e sistemicamente (Fig. 6). Observou-se que na 2ª folha apenas inoculada, a expressão da atividade foi maior aos 9 DAT com o extrato de basidiocarpo a 10%, superior a água em 1200%, indicando indução sistêmica, e o filtrado de cultura a 10% foi superior à testemunha água em 100%. Resultados semelhantes foram obtidos por VIECELLI (2008), onde a atividade da β -1,3 glucanase em feijoeiro foi influenciada pelos tratamentos com extratos de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada com *P. griseola*, comprovando a sistemicidade do efeito também para esse patossistema.

Para outros patossistemas e indutores, inclusive provenientes de basidiomicetos, também tem-se verificado incremento na atividade dessa enzima. KUHN (2007) observou, em feijoeiros tratados com *B. cereus*, o aumento não significativo da atividade específica de β -1,3 glucanases, enquanto que o indutor abiótico ASM aumentou significativamente a atividade dessa enzima. GUARDA; DIPIERO (2007) observaram aumento da atividade de glucanases em plantas de feijão tratadas com quitosana e inoculadas com *C. lindemuthianum*. IURKIV (2009) verificou que frações proteicas, obtidas por cromatografia de filtração em gel a partir de extrato de basidiocarpo de *P. sanguineus*, induziram a atividade específica de β -1,3 glucanases em cotilédones de soja, superior em 260% à testemunha água. FIORI-SUZUKI *et al.* (2008) verificaram aumento da atividade de β -1,3 glucanases em maracujazeiros inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e tratados com extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* nas concentrações 20 e 40%.

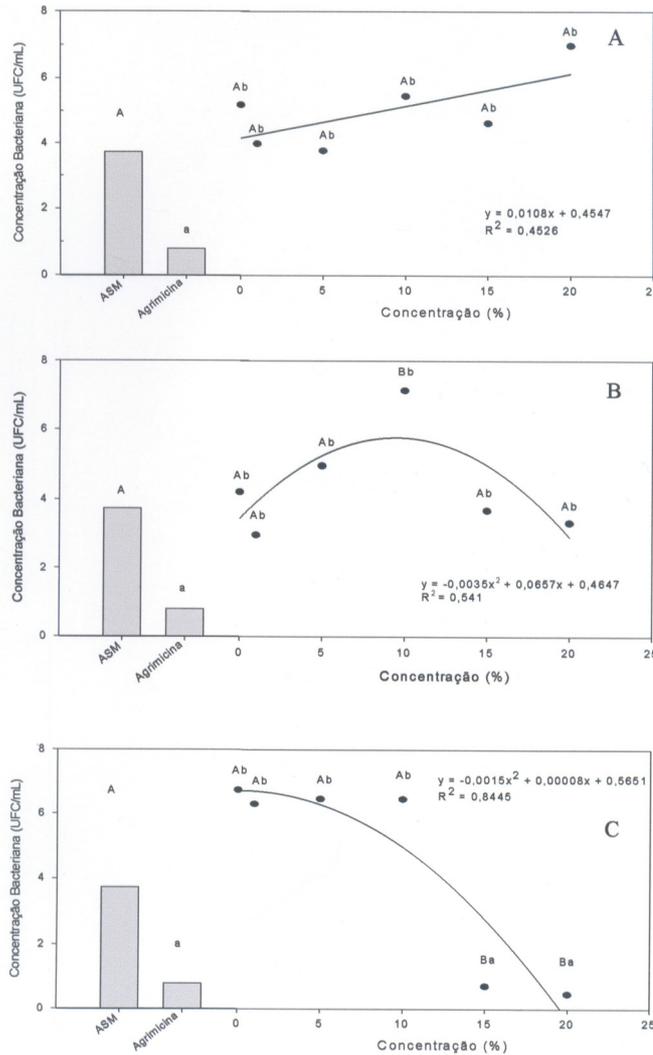


Fig. 1 - Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de micélio (A), filtrado de cultura (B) e basidiocarpo (C) de *Pycnoporus sanguineus* sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua comparação com o efeito de antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e acibenzolar-S-metil (ASM) (125 mg i.a. L⁻¹), no crescimento bacteriano. Valores seguidos de mesma letra (maiuscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com antibiótico) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

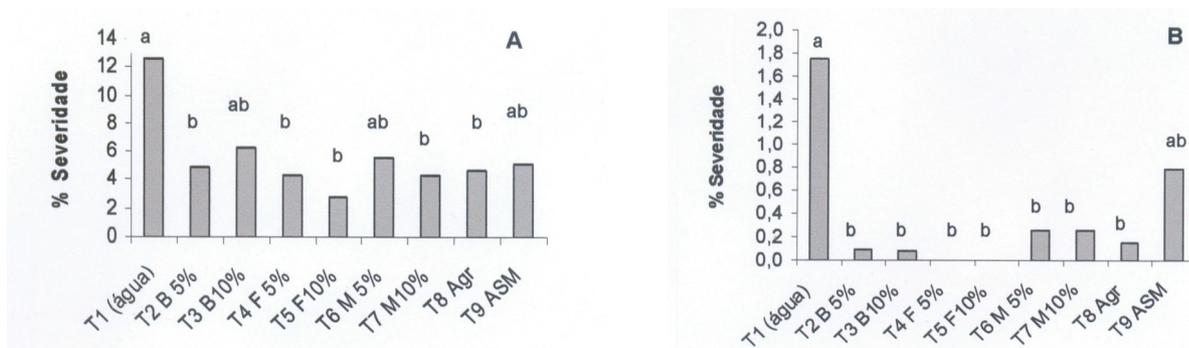
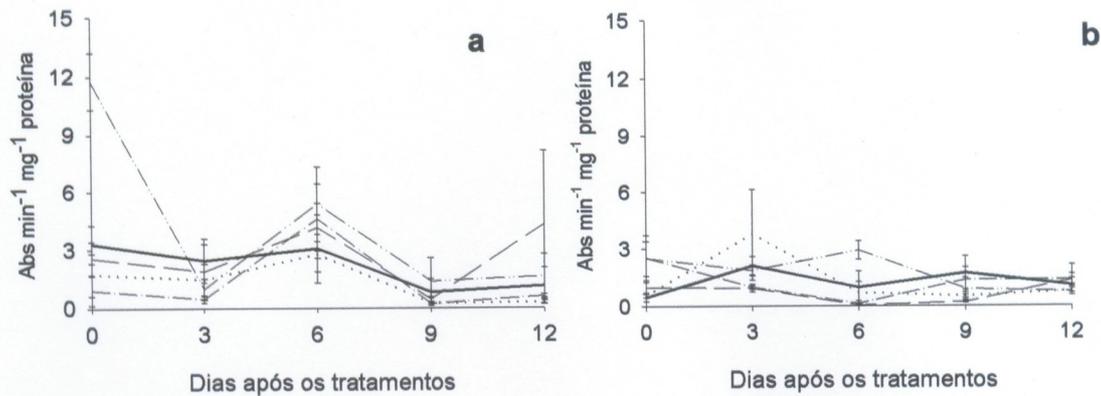
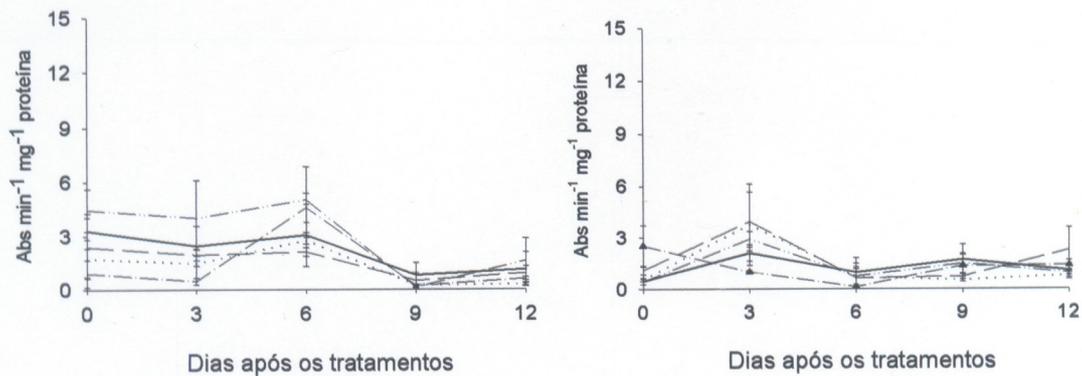


Fig. 2 - Severidade para crescimento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de basidiocarpo (T2B e T3B), de filtrado de cultura (T4F e T5F) e de micélio (T6M e T7M) de *P. sanguineus* em concentrações de 5 e 10%, na primeira folha tratada e inoculada (A) e na segunda folha apenas inoculada (B), em condições de casa de vegetação. Agr: antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina); ASM: acibenzolar-S-metil (125 mg i.a. L⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

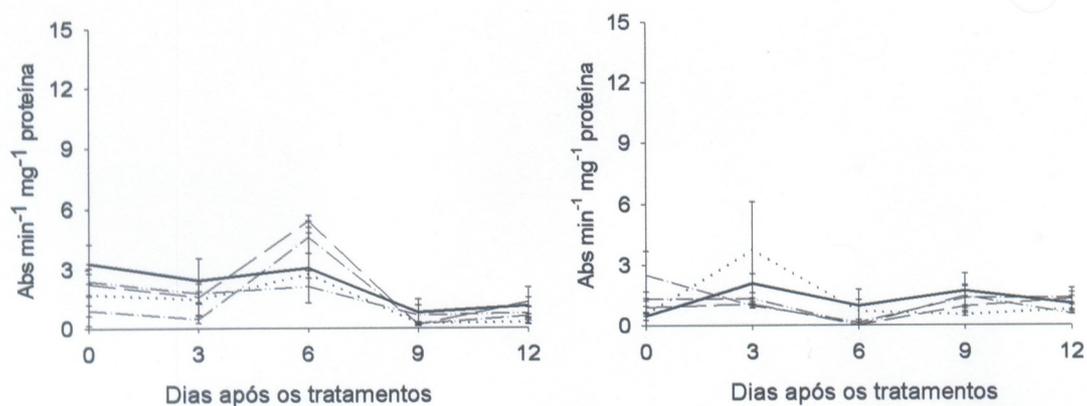


Fig. 3 - Atividade específica de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (-), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (····), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (- - -) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 5% (- · - ·) e basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 10% (- - -). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada de planta tratada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

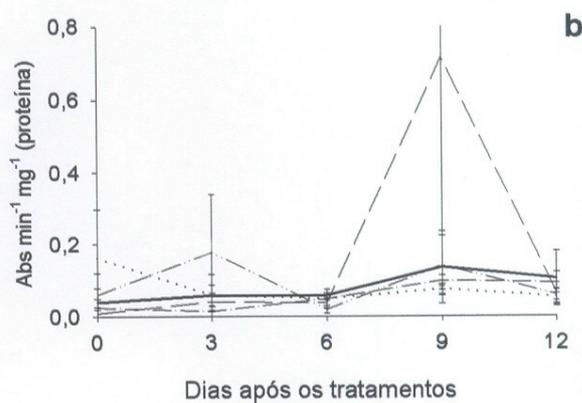
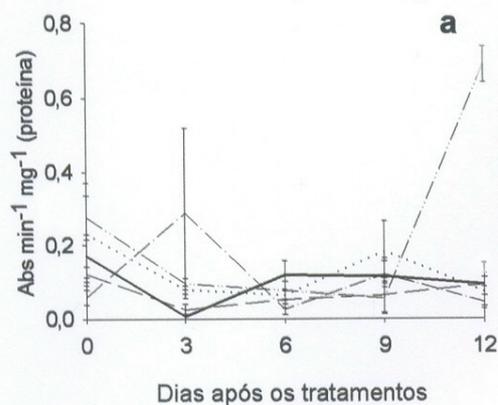
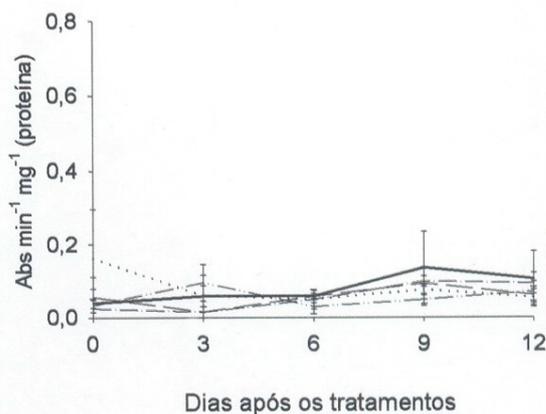
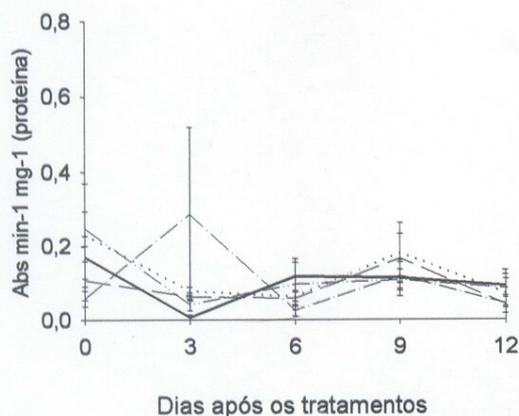
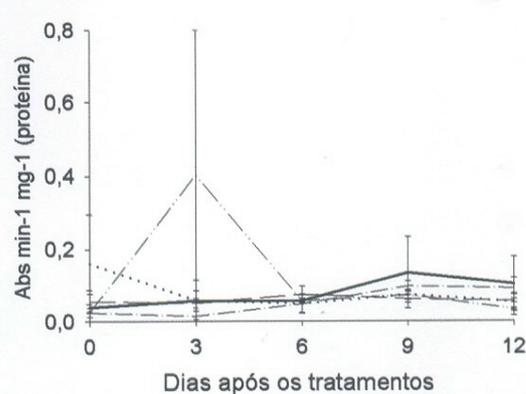
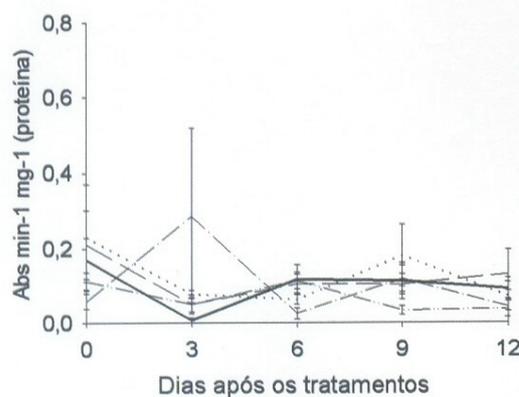
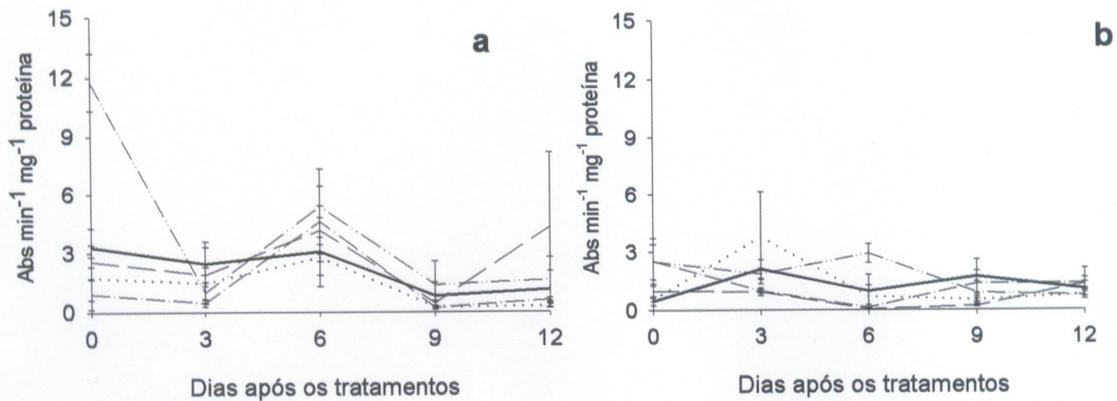
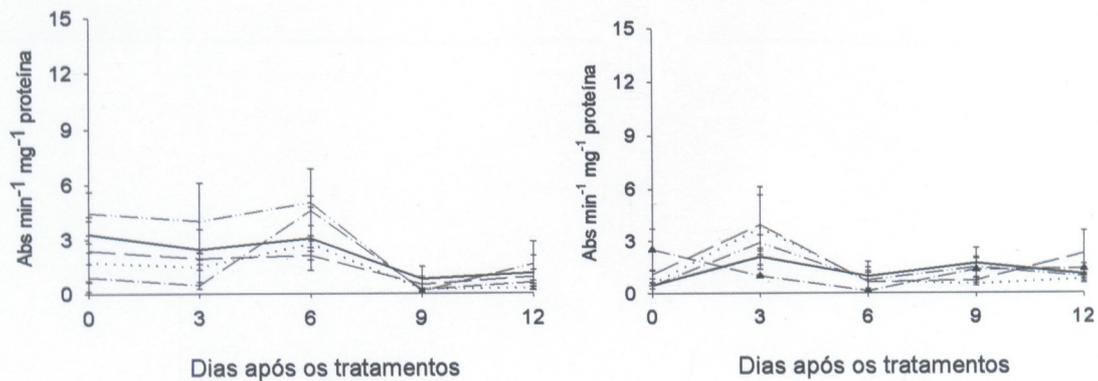
Basidiocarpo**Filtrado****Micélio**

Fig. 4 - Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (-), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (····), acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (---) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 5% (-·-·), e basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 10% (- -). (a) e (b) representam respectivamente a 1ª folha tratada e inoculada, e a 2ª folha apenas inoculada de planta tratada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

Basidiocarpo



Filtrado



Micélio

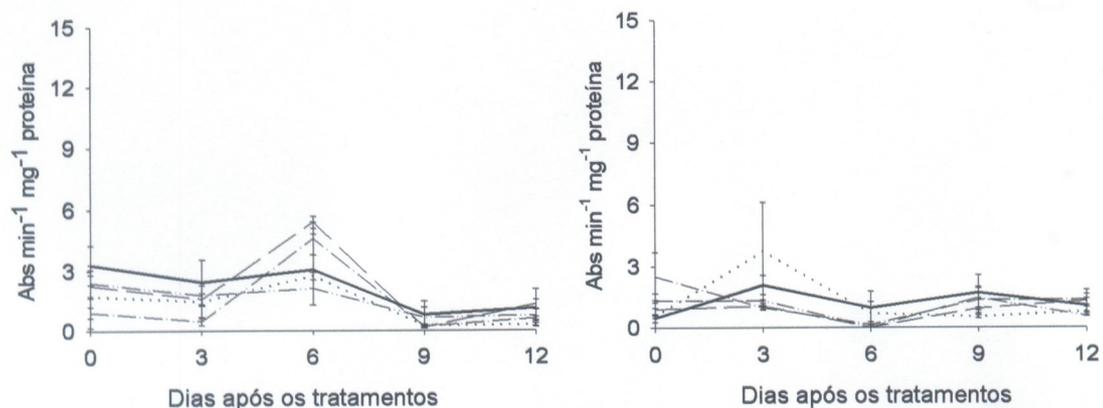


Fig. 5 - Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (-), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (····) acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (- - -) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 5% (- · - ·), e basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 10% (- - -). (a) e (b) representam respectivamente a 1^a folha tratada e inoculada, e a 2^a folha apenas inoculada de planta tratada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

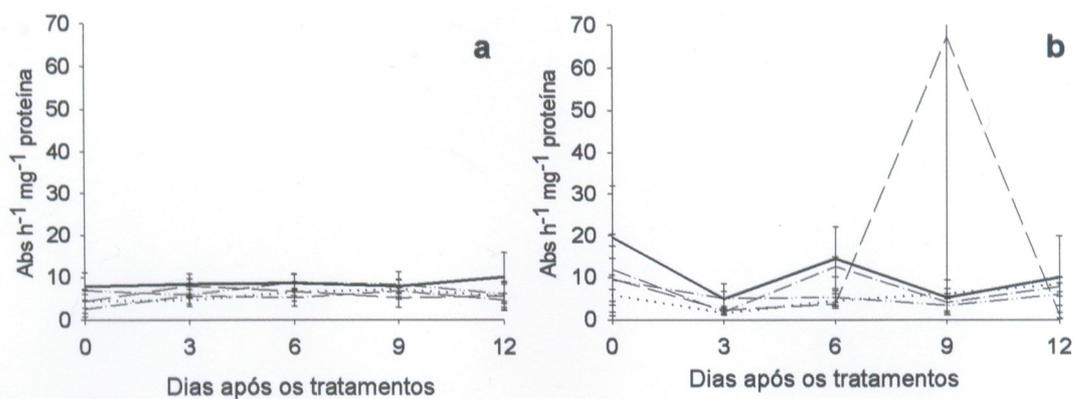
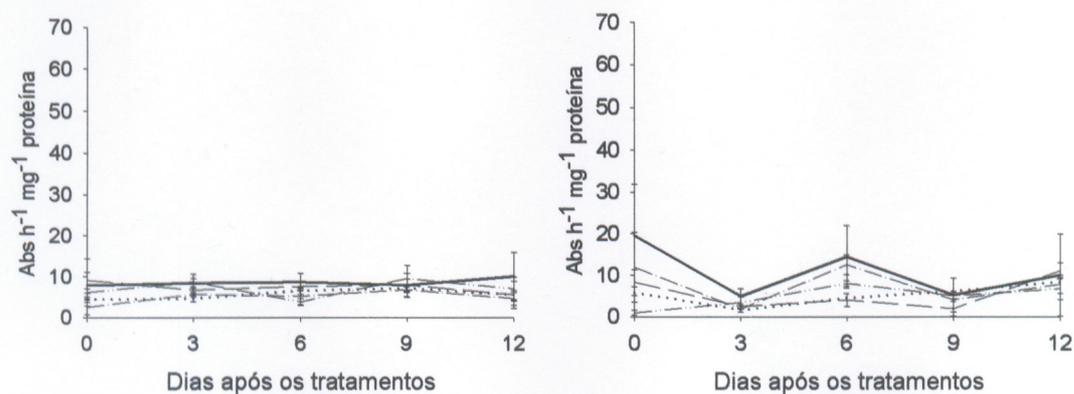
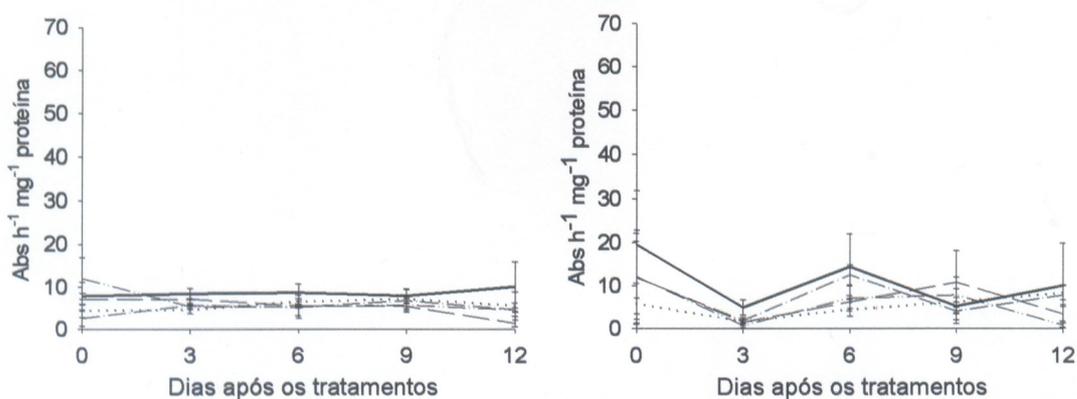
Basidiocarpo**Filtrado****Micélio**

Fig. 6 - Atividade específica de β -1,3 glucanase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após os tratamentos com os controles água (-), antibiótico (Agrimicina: 22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) (····) acibenzolar-S-metil (ASM 125 mg i.a. L⁻¹) (- - -) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 5% (- · - ·) e basidiocarpo, filtrado de cultura e micélio a 10% (- - -). (a) e (b) representam respectivamente a 1^a folha tratada e inoculada, e a 2^a folha apenas inoculada de planta tratada. Barras indicam a média +/- o erro padrão.

CAVALCANTI *et al.* (2006) verificaram que suspensão de quitosana, proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*, conferiu capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pela promoção do aumento na atividade de quitinase e β -1,3 glucanase.

Os resultados deste trabalho indicaram o potencial de extratos provenientes de *P. sanguineus* para o controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase e polifenoloxidase, com consequente redução da severidade da doença.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária e à FINEP pelo apoio financeiro na execução do projeto. JRS e KRFSE agradecem ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

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, Marechal Cândido Rondon, 2005.

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, Marechal Cândido Rondon, 2008.

BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.94, 2008. Suplemento.

BIANCHINI, A; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). *Manual de fitopatologia - Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Editora Ceres, 2005. p.333-349.

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.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de

quitinase e beta-1,3-glucanase após elicitação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006.

DI PIERO, M.R.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. *Summa Phytopathologica*, v.30, p.243-250, 2004.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. 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.29-50.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, v.64, p.351-359, 1999.

FIORI-SUZUKI, C.C.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BONALDO, S.M.; ITAKO, A.T.; TOLENTINO JUNIOR, J.B. Ativação da enzima glucanase em folhas de plantas de maracujazeiro tratadas com extratos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.104, 2008. Suplemento.

GUARDA, M.V.; DI PIERO, R.M. Atividade de glucanases e peroxidases em plantas de feijão tratadas com quitosana. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.184, 2007. Suplemento.

IURKIV, L. *Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de Pycnoporus sanguineus no controle de ferrugem asiática em soja*. 2009. 117p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

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

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.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.27-35.

MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; FRANZENER, G.; YURKIV, L.; BRAGA, C.L.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquoso de *P. sanguineus*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.304, 2007. Suplemento.

- PEITER-BENINCA, C.P.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n.3, p.285-292, 2008. Disponível: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_3/beninca.pdf>.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: Embrapa, 1994. p.217-242.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, S.A.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.). *A cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1996. p.669-722.
- 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, A.; DELLE MONADHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, v.45, p.177-181, 1995.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. *Summa Phytopathologica*, v.26, p.34-42, 2000.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biociência & Desenvolvimento*, n.11, p.16-21, 1999.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; FRANZENER, G. Phenols, β -1-3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turicum* in maize genotypes. *Summa Phytopathologica*, v.31, n.3, p. 261-267, 2005.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.16, p.265-304, 2008.
- VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v.1, p.341-350.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. A software for plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch, New Zealand. *Anais*. Christchurch, 2003. p.105.
- 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, Marechal Cândido Rondon, 2008.
- VIECELLI, C.A.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Efeito *in vitro* de extratos de *Pycnoporus sanguineus* sobre *Pseudocercospora griseola*. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.52, 2008. Suplemento.

Recebido em 11/5/09

Aceito em 13/10/09