

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS
CAMPUS DOIS VIZINHOS

MYCHELI PREUSS DA CRUZ

**COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Ganoderma lucidum* NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A OÍDIO EM SOJA E NA
TOXICIDADE A ORGANISMOS NÃO- ALVO.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DOIS VIZINHOS
2019**

MYCHELI PREUSS DA CRUZ

**COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Ganoderma lucidum* NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A OÍDIO EM SOJA E A TOXICIDADE
A ORGANISMOS NÃO-ALVO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro.

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Menino Destéfani Vítola

**DOIS VIZINHOS
2019**

C957c Cruz, Mycheli Preuss da.

Composto bioativos de *Ganoderma lucidum* na indução de resistência em plantas de soja no controle de oídio (*Erysiphe diffusa*) e na toxicidade a organismos não alvo. / Mycheli Preuss da Cruz – Dois Vizinhos, 2019.

126 f.:il.

Orientadora: Profº Dr. Sérgio Miguel Mazaro.

Coorientador: Profº Dr. Francisco Menino Destéfanis Vítola.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2019.

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB:

9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 29

COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Ganoderma lucidum* NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE SOJA NO CONTROLE DE OÍDIO (*Erysiphe diffusa*) E NA TOXICIDADE A ORGANISMOS NÃO ALVO

Mycheli Preuss da Cruz

Dissertação apresentada às treze e trinta horas do dia doze de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Dr. Sérgio Miguel Mazaro UTFPR - DV

**Dr. Edgar de Souza Vismara
UTFPR-DV**

**Dra. Cacilda Marcia Duarte Rios
UNICENTRO - Guarapuava**

**Coordenador(a) do PPGSIS
Assinatura e carimbo**

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

*Dedico este trabalho
aos meu pais e minha irmã,
pois sempre me incentivaram a trilhar o caminho dos estudos,
e aos educadores e educadoras que foram luzes desta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Ao pensar a quem devo agradecer por ter chegado até aqui, sinto-me contente em perceber que muitas pessoas fazem parte de minha trajetória e merecem todo o meu reconhecimento.

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades, pela saúde e força para lutar dia a dia, por Ele ser a certeza de que aqui temos uma missão.

Ao mestre Sérgio Miguel Mazaro por sua orientação, ensinamentos, confiança e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. Minha gratidão eterna a todos os ensinamentos e momentos de convivência.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UTFPR por toda colaboração, amizade e convivência. Em especial aos amigos mais próximos Nean Locatelli e Stheffani Lucca.

Ao grupo de toxicologia da UTFPR, coordenado pela professora Prof^a Patricia de Freitas, em especial ao aluno Lucas Trentin que esteve me auxiliando nas análises de embriotoxicologia.

Aos meus amigos e colegas do programa de Pós-graduação, em especial Barbara e Daiane por serem pessoas especiais e dividirem comigo alegrias, incertezas, sonhos e angústias.

Aos meus pais Janice e Ayrton e irmã Martyna que sempre incentivaram na realização dos meus sonhos, pelo carinho e motivação.

Aos professores Dr. Francisco Menino Destéfani Vítola, Dr. Egar de Souza Vismara e Patricia de Freitas, por auxiliarem na elaboração deste trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (PPGSIS) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

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

RESUMO

O *Ganoderma lucidum* é um cogumelo medicinal muito utilizado nos países orientais e atualmente em âmbito mundial. Seu corpo de frutificação e micélio são compostos por polissacarídeos, triterpenos e mais de 200 metabólitos secundários. Estes compostos exibem uma gama de bioatividades, como ação antiinflamatória, antitumorigênica, antibacteriana e antifúngica. Inúmeras publicações científicas demonstram o potencial e atuação dos compostos de *G. lucidum* no controle de doenças em animais e seres humanos. Porém, ainda são escassas as informações sobre o efeito desses metabólitos secundários no controle de fitopatógenos, seja de forma direta ou ativando mecanismos de defesa das plantas. Na busca de novas moléculas que possuam atividade indutora e no controle de doenças, este trabalho teve como objetivo avaliar os compostos bioativos produzidos por *G. lucidum* através do cultivo em meio líquido sob eliciação, para controle de oídio (*Erysiphe diffusa*) em plantas de soja. Foram avaliadas a ativação de mecanismos de defesa de plantas e a toxicidade a organismos não-alvo. Os compostos testados foram: C01- controle (água destilada); C02- Oxicloreto de cobre ($1,0\text{L ha}^{-1}$); C03- Azoxistrobina + Ciproconazol ($1,0\text{ L ha}^{-1}$), FC01- filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação padrão lignina (5%), FC02- filtrado da eliciação com, FC03- filtrado da eliciação com ácido salicílico (AS) 2 mM. Os dados foram todos analisados utilizando o software R[®]. Os filtrados de *Ganoderma* eliciado com AS apresentaram ação fungicida sobre o oídio (*Erysiphe diffusa*) *in vitro*, sendo a concentração inibitória mínima de 5 mg/mL^{-1} . Os filtrados de *Ganoderma* demonstraram potencial de indução de resistência em plantas de soja pela ativação de fitoalexinas, ativação da enzima fenilalanina amônia-liase, incremento de compostos fenólicos, atividade de peroxidases e da enzima quitinase, sendo que tal indução possui especificidade em relação ao tempo de ativação e associação com eliciadores. Os FCM (filtrados de crescimento micelial) possuem potencial fungicida quando aplicados em plantas de soja infectadas por oídio, reduzindo a severidade da doença. Os FCM demonstraram ser atóxicos a organismos não-alvo. Novos trabalhos devem ser considerados, buscando identificar e isolar os princípios ativos presentes nos FCM, bem como avaliar a ação destas mesmas substâncias em outros patossistemas de interesse agrícola.

Palavras-chave: Cogumelo medicinal, cultivo submerso, bioprospecção, controle alternativo, eliciação.

ABSTRACT

The *Ganoderma lucidum* is a medicinal fungi widely used in Eastern countries and currently worldwide. Its fruiting body and mycelium are composed of polysaccharides, triterpenes and more than 200 secondary metabolites. These compounds exhibit a range of bioactivities, such as anti-inflammatory, antitumorigenic, antibacterial and antifungal action. Multiple scientific publications demonstrate the potential and performance of the compounds of *G. lucidum* in the control of diseases in animals and humans. However, the information about the effect of these secondary metabolites on plant pathogens control still scarce, either in direct form or by activating plant defense mechanisms. In the research of new molecules that have induction activity and/or direct toxicity against fitopathogenic fungi, the aim of this work was to evaluate the bioactive compounds produced by *G. lucidum* through liquid culture under elicitation, to control powdery mildew (*Erysiphe diffusa*) in soybean plants. The activation of plant defense mechanisms, and toxicity to non-target organisms were evaluated. The compounds tested were: C01- control (distilled water); C02- Copper oxychloride (1,0 L ha⁻¹); C03- Azoxystrobin + Ciproconazole (1,0 L ha⁻¹), FC01- filtered mycelial growth broth of *G. lucidum* without elicitation, FC02- elicitation filtrate with lignin standard (5%); FC03- filtered from the culture elicited with 2 mM salicylic acid (SA). The data were all analyzed using the R[®] software. The *Ganoderma* filtrate associated with SA showed fungicidal action on powdery mildew (*Erysiphe diffusa*) *in vitro*, with a minimum inhibitory concentration of 5 mg mL⁻¹. The *Ganoderma* filtrates demonstrated the potential of induction of resistance in soybean plants by the activation of phytoalexins, activation of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, increase of phenolic compounds, peroxidases and chitinase enzyme activity. Such activity has specificity in relation to time and association with elicitors. The MGF (mycelial growth filtrate) have fungicidal potential when applied to soybean plants infected by powdery mildew, reducing disease severity. The MGF had been proved to be non-toxic to non-target organisms. New researches should be considered, seeking to identify and isolate the active principles present in the MGF, as well as in other pathosystems of agricultural interest.

Keywords: medicinal fungi, submerged culture, bioprospecting, alternative control, elicitation.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) dos tratamentos sobre <i>Erysiphe diffusa</i> . UTFPR Campus Dois Vizinhos, 2019. | 72 |
| Tabela 2- Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja pelos FCM de <i>G. lucidum</i> submetidos a diferentes tratamentos de elicitação. UTFPR – Campus Dois Vizinhos, 2019. | 79 |
| Tabela 3 - Proteínas totais (mg.g tecido ⁻¹) de plantas de soja tratados com FCM de <i>G.lucidum</i> e oxiclreto de cobre. UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019..... | 82 |
| Tabela 4 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg./g.tecido) em plantas de soja tratadas com FCM de <i>G.lucidum</i> e oxiclreto de cobre . UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019..... | 84 |
| Tabela 5- Compostos fenólicos (mg.g tecido ⁻¹) de plantas de soja, tratadas com FCM de <i>G.lucidum</i> e oxiclreto de cobre . UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019. | 86 |
| Tabela 6 - Atividade de Peroxidases (unidade enzimática.minuto-1) de plantas de soja, tratadas com FCM de <i>G.lucidum</i> e oxiclreto de cobre UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019..... | 89 |
| Tabela 6 - Atividade de quitinase (UAbs.min-1mg proteína-1) de plantas de soja, tratadas com FCM de <i>G.lucidum</i> e oxiclreto de cobre UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019..... | 92 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Ciclo de vida de um cogumelo e suas partes morfológicas (Basidiomycota). Fonte: casa das ciências (2014). 17
- Figura 2-Ciclo de vida do cogumelo na natureza (A) e cultivado em laboratório (B) a partir de tecido de um cogumelo em substrato adequado. Fonte: Van Nieuwenhuijzen (2007). 18
- Os basidiomicetos destacam-se também por sua capacidade biodegradadora de resíduos naturais. Fungos deste filo são produtores de importantes grupos de enzimas, as celulases e as lignases que desempenham papel fundamental no ciclo do carbono, por meio de decomposição de resíduos vegetais (URBEN, 2017). 18
- Figura 3- Fotografias de *Ganoderma lucidum*. Corpos de frutificação (A); micélio (B); e esporos(C). Fonte: (A) Petersen (1982); (B) o autor (2018); (C) Vermaas (2003). 20
- Figura 4.-Imagens do micélio de *Ganoderma lucidum*, em meio de cultivo artificial de laboratório. Fonte: o autor (2019). 21
- Figura 5- Métodos de cultivo para produção de *G. lucidum*. Fonte: Berovic et al. (2012), adaptado por Atoji-Henrique (2015). 23
- Figura 6- Cultivo de micélio de *Ganoderma lucidum* em meio líquido (A) em erlenmeyer; (B) em biorreator Fonte: (A) o autor (2019); (B) Petre e Petre (2013). 24
- Figura 7-Tamanhos de pellets de *G. lucidum* obtidos com a adição de polímeros ao cultivo, visando a menor granulometria possível: controle (sem adição de ágar) (a); adição de 0,1% de ágar (b); adição de 0,2% de ágar (c); adição de 0,4% de ágar (d). Fonte: Yang, Yang e Chen (2009). 27
- Figura 8- Desenvolvimento de pellets na pré-cultura de *Ganoderma lucidum* . (a) dia 7, escala bar = 0,25 mm; (b) dia 7, escala bar = 0,1 mm; (c) dia 9, escala bar = 1,5 mm; (d) dia 9, escala bar = 1,0 mm; (e) dia 13, escala bar = 1,5 mm;

| | |
|---|----|
| (f) dia 13, escala bar = 0,8 mm; (g) dia 20, escala bar = 1,5 mm, (h) dia 20, escala bar = 0,3 mm..Fonte: Wagner et al. (2004). | 29 |
| Figura 9- Estrutura química do lanosterol e três dos muitos triterpenos isolados de <i>Ganoderma lucidum</i> . Fonte: Kubota et al. (1982)..... | 32 |
| Figura 10-Ação antagonista de <i>Ganoderma lucidum</i> a fungos contaminantes observados in vitro. Fonte: o autor (2019)..... | 35 |
| Figura 11-Representação esquemática da potencial cascata de eventos celulares que constituem a via de sinalização de ROs mediada por AS. Fonte: Liu et al. (2018). | 37 |
| Figura 12- Representação esquemática da co-evolução entre plantas e patógenos. Fonte: Jones; Dangls (2006), com adaptações. | 43 |
| Figura 13- Diagrama demonstrando o processo de fermentação em meio líquido de <i>Ganoderma lucidum</i> , que inicialmente teve um período de incubação de 15 dias. Posteriormente, foi realizada a eliciação, permanecendo o fungo por mais 35 dias em fermentação submersa. Após período total de 50 dias, foram obtidos os filtrado do crescimento micelial (FCM), que consistiram em: C01 - controle, F01 - filtrado do crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina, FC03 - filtrado da eliciação com AS. Estes filtrados foram utilizados nos diferentes tratamentos aplicados nos experimentos descritos nas seções subsequentes. Fonte: o autor, (2019).... | 53 |
| Figura 14-Diagrama demonstrando os bioensaios que foram realizados com os FCM de <i>Ganoderma lucidum</i> . Fonte: o autor, (2019)..... | 53 |
| Figura 15-Teste de efeito antifúngico in vitro pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços. Fonte: o autor (2019)..... | 56 |
| Figura 16-Área utilizada para realização do experimento, plantas com alta incidência de doença. Fonte: o autor, (2019). | 57 |
| Figura 17- (A) Plantas de soja antes da aplicação dos tratamentos, (B) marcador para aplicação dos tratamentos, (C) plantas no momento da aplicação dos tratamentos.Fonte: o autor (2019). | 58 |
| Figura 18-Esquema das condições nos ensaios de proteção de plantas de soja em casa de vegetação (hpa: horas após aplicação). Fonte: o autor (2018)... | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 19-Escala diagramática para severidade do oídio da soja. Fonte: Mattiazzi, 2003. | 65 |
| Figura 20-Coleta dos embriões para análise por montagem total. A: abertura do ovo, B: embrião (tracejado), C: Coleta e fixação em papel filtro, D: montagem em lâmina permanente. Fonte: o autor (2019). | 68 |
| Figura 21-Embriões de 3 dias de desenvolvimento. A: Estádio 16. B: Estádio 17. C: Estádio 18. D: Estádio 19. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951). | 69 |
| Figura 22-Embriões nos estádios embrionários 13, 14, 15 e 16. AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BC = Broto da cauda; C = Coração; D = Diencefalo; M = Mesencefalo; MI = Mielencefalo; MT = Metencefalo; O = Vesícula óptica; S = Somitos; T = Telencefalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951). | 70 |
| Figura 23- Embriões nos estádios embrionários 17, 18, 19 e 20. AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BA = Broto da asa; BC = Broto da cauda; BP = Broto da perna C = Coração; D = Diencefalo; FC = Flexura cervical; M = Mesencefalo; MT = Metencefalo; N = Neuróporo anterior; O = Vesícula óptica; R = Romboencefalo; S = Somitos; T = Telencefalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951). | 70 |
| Figura 24- Soma dos postos para as notas de incidência de oídio na faixa do folíolo pulverizado, utilizando-se a escala de notas proposta, sendo: 0- sem controle; 1- baixo controle; 2- controle; S- sistêmico. As avaliações ocorreram em 2, 5, 7 e 10 dias após as aplicação, onde C01 - água destilada; C02 - oxiclóreto de cobre .C03 - Azoxistrobina + Ciproconazol; F01 - filtrado do crescimento micelial de G.lucidum sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina; FC03 - filtrado da eliciação com AS. As avaliações de severidade de doença ocorreram a 2, 5, 7 e 10 dias após aplicação. Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos pelo teste de Friedman, onde os dados foram ordenados em ranks. Fonte: o autor (2019). | 76 |
| Figura 26-Viabilidade dos embriões, Frêquencia cardíaca e estágios do desenvolvimento dos embriões de Gallus gallus domesticus L. tratados com os FCM, onde: CF- controle fechado, CV- controle com meio BD; FC01- filtrado do crescimento micelial de G.lucidum sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação | |

com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Letras diferentes indicam
variação estatística entre os tratamentos. Fonte: o autor (2019). 97

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--------------------------------------|
| AS | Ácido salicílico |
| ASM | Acibenzolar-S-methy |
| BD | Meio de cultura Batata Destroxe |
| BDA | Meio de cultura Batata Destroxe ágar |
| BDO | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| CBB | Azul Brilhante de Coomassie |
| DNS | Dinitrosalicilato |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etileno diamina tetra acético |
| EROs | Especies reativas de oxigênio |
| FAL | Fenilalanina amônia liase |
| FCM | Filtrados do crescimento micelial |
| HCL | Ácido clorídrico |
| Hpa | Hora após a aplicação |
| Hpi | Hora após a inoculação |
| MCA | Metanol, clorofórmio e água |
| Min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimol |
| mg | Miligrama |
| mg/mL | Miligrama por mL |
| nm | Nanômetro |
| °C | Graus Celsius |
| RPM | Proteínas relacionadas à patogênese |
| PVPP | Polivinilpirrolidona |
| RSA | Resistência local adquirida |
| RSI | Resistência sistêmica adquirida |
| ® | Marca registrada |
| µL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 Cogumelos medicinais | 16 |
| 2.2 <i>Ganoderma lucidum</i> | 18 |
| 2.2.1 Produção e cultivo | 22 |
| 2.2.2 Compostos biologicamente ativos | 30 |
| 2.2.3 Atividade antimicrobiana..... | 33 |
| 2.2.4 Eliciação e produção de metabólitos secundários | 34 |
| 2.3 Indução de Resistência em plantas | 38 |
| 2.3.1 Como as plantas percebem e se defendem dos patógenos | 40 |
| 2.4 Patossistema estudado: oídio da soja (<i>Erysiphe diffusa</i>) | 45 |
| 2.4.1 Sintomatologia | 46 |
| 2.4.2 Ciclo relação patógeno-hospedeiro | 47 |
| 2.4.3 Controle | 48 |
| 2.5 Toxicologia a organismos não-alvo | 49 |
| 2.5.1 Embriotoxicologia- desenvolvimento embrionário inicial de <i>Gallus gallus domesticus</i> L..... | 49 |
| 2.5.2 Ecotoxicologia pelo uso de <i>Artemia salina</i> como indicador..... | 51 |
| 3.MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 3.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos e material vegetal | 54 |
| 3.2 Cultivo em meio líquido e eliciação | 54 |
| 3.3 Efeito antifúngico dos filtrados do crescimento micelial | 55 |
| 3.3.1 Efeito <i>in vitro</i> : determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 55 |
| 3.3.2 Efeito <i>in vivo</i> : aplicação foliar em plantas de soja..... | 56 |
| 3.4 Efeito da na Indução de Resistência em plantas | 59 |
| 3.4.1 Ativação de fitoalexinas em cotilédones de soja..... | 59 |
| 3.4.2 Proteção de plantas de soja em casa de vegetação..... | 59 |
| 3.4.3 Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa..... | 61 |
| 3.4.3.1 Obtenção dos extratos proteicos | 61 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.3.2 | Proteínas totais | 61 |
| 3.4.3.3 | Atividade de fenilalanina amônia-liase | 61 |
| 3.4.3.4 | Quantificação de compostos fenólicos totais | 62 |
| 3.4.3.5 | Atividade de Peroxidases | 62 |
| 3.4.3.6 | Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases..... | 63 |
| 3.4.4 | Avaliação da doença..... | 64 |
| 3.5 | Toxicidade a organismos não-alvo | 66 |
| 3.5.1 | Avaliação de ecotoxicologia uso de <i>Artemia salina</i> | 66 |
| 3.5.2 | Análise do desenvolvimento embrionário inicial de <i>Gallus gallus domesticus</i> <i>L.</i> | 66 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 71 |
| 4.1 | Efeito antifúngico dos filtrados do crescimento micelial..... | 71 |
| 4.4.1 | Efeito <i>in vitro</i> : determinação da concentração inibitória mínima (CIM) | 71 |
| 4.4.2 | Efeito <i>in vivo</i> : aplicação foliar em plantas de soja..... | 75 |
| 4.2 | Efeito na Indução de Resistências em plantas | 77 |
| 4.2.1 | Ativação de fitoalexinas em cotilédones de soja..... | 77 |
| 4.2.2 | Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa..... | 81 |
| 4.2.2.1 | Proteínas totais | 81 |
| 4.2.2.2 | Fenilalanina amônia-liase (FAL) | 83 |
| 4.2.2.3 | Fenóis totais..... | 85 |
| 4.2.2.4 | Peroxidases | 88 |
| 4.2.2.5 | Quitinase..... | 91 |
| 4.2.3 | Avaliação da doença em casa vegetação..... | 93 |
| 4.3 | Toxicidade a organismos não-alvo | 96 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 99 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |
| 7. | ANEXOS..... | 119 |
| ANEXO 1: | TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL - EMBRAPA/UTFPR | 119 |
| ANEXO 2: | PARECER DE APROVAÇÃO NO CEUA – UTFPR | 119 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do mundo. Em 2017/2018 de acordo com o relatório da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) produziu 119,28 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2018). No entanto, as doenças representam um grande desafio para a produtividade e sustentabilidade da cultura devido a perdas e problemas relacionados ao uso abusivo de agroquímicos.

Dentre essas doenças o oídio [*Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu] possui importância, pois representa perdas significativas nas lavouras de soja (DE ALMEIDA; FORCELINI; FIALLOS, 2017). Essa doença é favorecida por temperaturas em torno de 20°C e umidade relativa na faixa de 50 a 90%. Dependendo do nível de infestação da doença na planta, grandes perdas nas taxas fotossintéticas são percebidas, fato que desencadeia reações negativas para o desenvolvimento da leguminosa (BLUM et al., 2002).

O controle de doenças sempre foi uma das grandes preocupações dos agricultores e dos profissionais da área da fitopatologia, já que afetam as culturas de maior poder econômico, causando grandes perdas em produtividade. Os fungicidas nas últimas décadas foram considerados o principal método de controle utilizado no manejo de doenças, pois apresentam praticidade de uso e eficiência. Contudo, aplicações intensivas e errôneas trouxeram consequências negativas como perda de efetividade, seleção de agentes fitopatogênicos resistentes, surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos), contaminação de alimentos e do solo (KLOSOWSKI et al., 2016). Além disto, a demanda pública por métodos de controle ambientalmente mais seguros impulsiona a indústria e produtores a buscar alternativas.

Nos últimos anos, métodos alternativos vêm sendo intensamente estudados e empregados na agricultura moderna. O uso de agentes de controle biológico (biocontrole), bioestimulantes, biopesticidas, biofungicidas e a indução de resistência de plantas a patógenos são estratégias em ascensão para controlar doenças de plantas, vistas como alternativas promissoras ao uso de fungicidas comerciais (BETTIOL, 2008).

Os ativadores biológicos começam a constituir uma nova classe de pesticidas, sendo chamados de “fungicidas de quarta geração”. Apresentam modo de atuação

diferente dos pesticidas até agora desenvolvidos, já que na maioria dos casos não exibem efeito direto sobre o patógeno, mas ativam mecanismos de defesa das plantas tornando-as mais resistentes (ROMEIRO, 2007).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, chamados de elicitores (SMITH, 1996). A ativação das defesas das plantas pode ocorrer a partir da elicitação com uso de organismos vivos como bactérias, fungos, vírus, nematóides e insetos, raças não virulentas de patógenos, além do próprio patógeno inativado, extratos de plantas, rizobactérias promotoras de crescimento, e ainda exopolissacarídeos bacterianos e fúngicos. A indução de resistência consiste na estimulação das defesas por meio de agentes externos, sem qualquer alteração no genoma da planta (STADNIK; BETTIOL, 2000). Atualmente, há indutores de resistência disponíveis comercialmente, os quais não vieram para substituir os fungicidas tradicionais, mas o seu uso em conjunto ou alternado pode conduzir a uma redução no número de aplicações dos agrotóxicos (DI PIERO et al., 2003; KUHN, 2007).

Os biofungicidas são compostos por microrganismos como fungos ou bactérias, com efeito direto sobre o patógeno; ou indireto, ativando genes de resistência (HARMAN, 2000). Esses microrganismos atuam secretando compostos químicos com ação antibiótica e antifúngica, como enzimas e metabólitos secundários, sendo o que leva ao sucesso do uso desses fungos como biofungicidas, uma vez que vários desses metabólitos secundários produzidos são tóxicos para os patógenos de plantas, mesmo em baixas concentrações (MORATH et al., 2012).

No momento atual, o processo industrial de biofungicidas se baseia na produção de conídios submersos, utilizando cultivo em meio líquido (KOBORI et al.; 2015). As vantagens dessa via de produção são a otimização do rendimento em biomassa e a produção com qualidade pois permite o controle de nutrientes, pH, temperatura e demais fatores ambientais. Ainda os microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema (WHIPPS, 1997). Dentro deste contexto, uma grande vantagem do uso do cultivo submerso está na possibilidade de extração de substâncias de interesse como os endopolissacarídeos (polissacarídeo intracelular - IPS) a partir da biomassa micelial, e exopolissacarídeos (polissacarídeo extracelular - EPS) isolados do caldo de

cultivo, que são biomoléculas de grande interesse farmacológico (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; RUBEL, 2006).

Embora várias empresas de biopesticidas já utilizem essa técnica de produção em meio líquido, ainda são escassos protocolos para produção e os resultados em rendimentos ainda podem ser melhorados, assim como o tempo de fermentação e a utilização de novos agentes biológicos com potencial para a base de biofungicidas (KOBORI et al., 2015).

Entre os agentes com potencial de produção de substâncias bioativas e indutores bióticos de resistência, temos *Ganoderma lucidum*, um cogumelo medicinal tradicionalmente utilizado na medicina oriental ao longo de alguns milhares de anos. Conhecido como "Lingzhi" ou "Reishi" no leste da Ásia e como "Cogumelo Rei" no Brasil (CAO et al., 2012), esse cogumelo sintetiza antibióticos, substâncias ativadoras do sistema imunológico, antivirais, antialérgicos e muitos outros compostos de interesse medicinal (LINDEQUIST et al., 2005; BOH et al., 2007).

Fungos superiores, como os cogumelos, são fonte de diversas substâncias, as quais podem ser exploradas para utilização no manejo de doenças de plantas. O uso e estudo dos cogumelos medicinais e/ou comestíveis no controle de doenças em plantas são relativamente recentes e concentram-se basicamente, nas espécies *Lentinula edodes* (shiitake), *Agaricus blazei* (= *A. subrufescens*) (cogumelo-do-sol) e *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau) (SCHWAN-ESTRADA et al., 2017).

Pesquisas com *G. lucidum* em plantas ainda são mínimas. Contudo, são inúmeros os relatos de trabalhos sobre o grande potencial e atuação dos compostos de *G. lucidum* no controle de doenças em animais e seres humanos. Suas características revelam um potencial para investigação de moléculas elicitoras com eventual uso para ativação de mecanismos de defesa em plantas. Além disso, na literatura a ausência de trabalhos relacionados a indutores de resistência obtidos de biomassas fúngicas de *G. lucidum* justifica a importância do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter compostos bioativos produzidos no cultivo em meio líquido de *Ganoderma lucidum* com potencial de controle de oídio em soja, seja pelo efeito biofungicida ou induzindo a resistência em plantas e que sejam atóxicos a organismos não-alvo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a eliciação em cultivo em meio líquido de *G. lucidum*, para produção de compostos bioativos (elicitors: ácido salicílico e lignina);
- b) Obter filtrado do crescimento micelial do cultivo em meio líquido;
- c) Avaliar o efeito dos filtrados *in vitro* e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) sobre oídio;
- d) Avaliar a aplicação dos filtrados *in vivo*, verificando o efeito na redução de oídio na soja;
- e) Verificar o efeito da aplicação foliar dos filtrados na indução de resistência em plantas;
- f) Testar os filtrados referente à possível toxicidade a organismos não-alvo, através de testes com uso de *Artemia salina* e ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus* L.);

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cogumelos medicinais

Os cogumelos fazem parte dos filos Basidiomycota e apresentam cerca de 15.000 espécies já descritas. São fungos de micélio septado, que se reproduzem por esporos exógenos (basidiosporos ou ascósporos), formados sobre uma hifa especial denominada basídio ou no interior de uma estrutura saquiforme denominada asco. São conhecidos desde os primórdios da humanidade, seja por sua toxidez, seja por suas propriedades nutracêuticas (nutricionais e medicinais) (HAWKSWORTH, 2001; MOORE-LANDECKER, 1982).

Ao longo dos tempos, lendas e mitos foram criados sobre os cogumelos, sendo considerados divindades, como se confirma em achados arqueológicos pré-colombianos e egípcios. Também foram apreciados por gregos e romanos sendo parte da culinária de muitos povos antigos (ALEXOPOLOS; MIMS, 1979).

Cogumelos são considerados um grupo especial de fungos por seu tamanho macroscópico, distinto corpo de frutificação e produção de bilhões de esporos. Suas frutificações podem ser de variadas cores vivas (amarela, laranja, vermelho, violeta ou verde), escuras (marrom ou preto) ou sem coloração (branco ou hialino). Apresentam consistência carnosa, de frágil a coriácea resistente, morfologicamente bastante variável, com formas curiosas (URBEN; OLIVEIRA, 1998).

O corpo de frutificação é a estrutura reprodutiva responsável por produzir e dispersar os esporos sexuais, que se originam de células características, chamadas de basídios (no caso dos basidiomicetos) ou ascos (no caso dos ascomicetos). O corpo de frutificação pode possuir em sua estrutura: píleo (ou chapéu), que é o corpo; estipe (ou pé), que é a parte do cogumelo que sustenta o chapéu; anel (ou annulus), que é um resto de véu parcial sobre o pé; e a volva, a porção do véu que envolve a parte basal do pé (**Figura 1**) (KANAGAWA; NEVES, 2011).

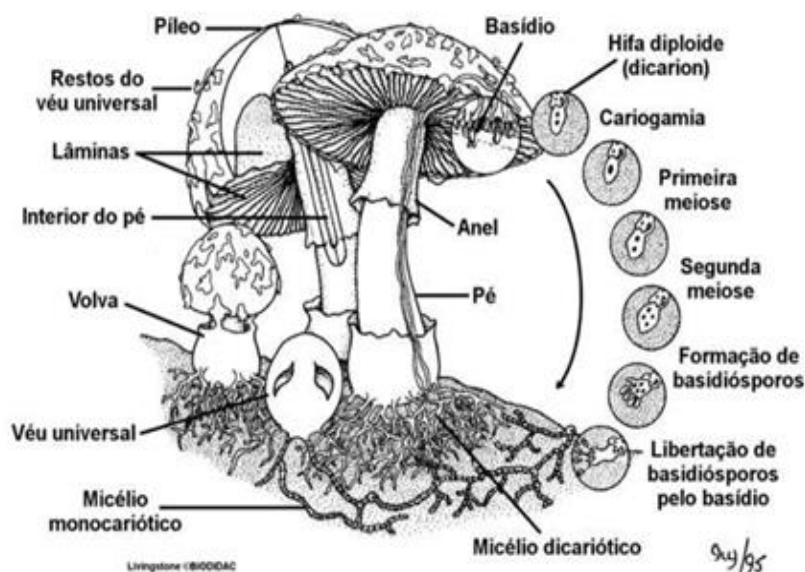


Figura 1– Ciclo de vida de um cogumelo e suas partes morfológicas (Basidiomycota). Fonte: casa das ciências (2014).

O micélio é a parte vegetativa do cogumelo, composto por várias hifas, formando uma trama de fibras que se espalham sobre o substrato após certo período de crescimento sob condições favoráveis. Para a maioria das espécies de cogumelos, a temperatura ótima para desenvolvimento é aproximadamente de 25°C e alta concentração de CO₂ (MILES; CHANG, 2004).

A reprodução dos basidiomicetos pode ocorrer sexuadamente por somatogamia, ou seja, pela união de hifas compatíveis, quando ao final do ciclo são produzidos basídios (gr. basidion = pequeno pedestal) com basidiósporos (gr. basidion + sporo = semente) haplóides (ALEXOPOLUS; MIMS, 1979). Os ascomicetos se reproduzem sexuadamente, de maneira muito semelhante; a diferença fundamental está no fato de os esporos (ascósporos), neste caso, serem produzidos no interior de estruturas saquiformes, denominadas ascos. A reprodução assexuada dos macromicetos (basidiomicetos e ascomicetos) ocorre na fase vegetativa por meio de fragmentação do micélio (artrósporos) e da produção de conídios, oídios e clamidósporos (**Figura 2.**) (KANAGAWA; NEVES, 2011).

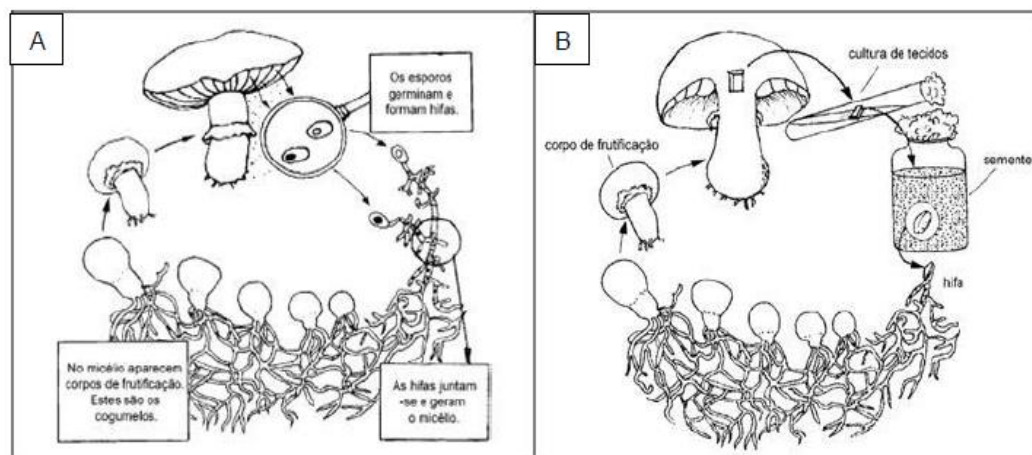


Figura 2-Ciclo de vida do cogumelo na natureza (A) e cultivado em laboratório (B) a partir de tecido de um cogumelo em substrato adequado. Fonte: Van Nieuwenhuijzen (2007).

Os basidiomicetos destacam-se também por sua capacidade biodegradadora de resíduos naturais. Fungos deste filo são produtores de importantes grupos de enzimas, as celulases e as lignases que desempenham papel fundamental no ciclo do carbono, por meio de decomposição de resíduos vegetais (URBEN, 2017).

A respeito das suas propriedades farmacológicas, os cogumelos apresentam uma grande importância econômica, graças às recentes descobertas e avanços no ramo da biotecnologia. Suas propriedades farmacológicas são avaliadas há muito tempo, porém muitos princípios ativos ainda não estão completamente elucidados. Muitos, senão todos os cogumelos contêm substâncias biologicamente ativas, em corpos de frutificação e micélio crescidos em meios de cultura (WASSER, 2014).

2.2 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum é um dos fungos mais conhecidos na medicina e tem sido amplamente utilizado para tratar doenças há milhares de anos na Ásia. Chamado Lingzhi (cogumelo da imortalidade) na China, conhecido no Japão como Reishi ou *Mannentake* ('Cogumelo Divino') e no Brasil, por "Cogumelo Rei" (NCBI, 2015; TOL, 2015). Na antiga China acreditava-se que Lingzhi trazia longevidade, devido ao seu misterioso poder de curar o corpo e acalmar a mente (HUIE; DI, 2004).

Altamente valorizado por suas propriedades medicinais e espirituais. Na antiguidade quem encontrasse esse cogumelo na natureza e o levasse para a Corte Imperial era muito bem recompensado, pois encontrá-lo era um sinal de felicidade,

boa sorte, boa saúde, longevidade e até imortalidade (WASSER; WEIS, 1999). Hoje sabe-se que em seu corpo de frutificação e micélio se encontra uma abundância de componentes bioativos (YU et al., 2012).

Este fungo é classificado na seguinte posição taxonômica (SEO; KIRK, 2000):

Reino: *Fungi*

Divisão: *Eumycota*

Classe: *Basidiomycetes*

Ordem: *Ganodermatales*

Família: *Ganodermataceae (Polyporaceae)*

Gênero: *Ganoderma*

Espécie: *lucidum*

Apresenta ciclo reprodutivo característico, com formação de corpo de frutificação, esporos, hifas e micélio (**Figura 3**). O desenvolvimento do basidiocarpo é geralmente anual e pode levar de 3 a 6 meses, dependendo da linhagem, substrato de cultivo e fatores bióticos e abióticos (URBEN, 2017). Corpo de frutificação apresenta formato de rim, com margens finas, geralmente curvadas para dentro e superfície rugosa com aparência envernizada, apresentando-se amarelada quando jovem e escurecendo para cor marrom avermelhada e posteriormente para um marrom escuro conforme amadurece (**Figura 3-A**). O seu micélio é denso, filamentoso, com aspecto radiado, de coloração branca quando jovem e amarelada a marrom quando adulto (**Figura 3-B**). A parede da hifa do micélio é constituída de camadas de polissacarídeos, que são macromoléculas compostas por açúcares simples existentes no citoplasma das células, como celulose e glucana (WASSER; WEIS, 1999; URBEN, 2017). Seus esporos são marrons, ovóides, truncados em uma das extremidades, com episporo macio e endósporo rígido, com uma grande gota central (**Figura 3-C**) (WASSER; WEIS, 1999; URBEN, 2017).



Figura 3- Fotografias de *Ganoderma lucidum*. Corpos de frutificação (A); micélio (B); e esporos(C). Fonte: (A) Petersen (1982); (B) o autor (2018); (C) Vermaas (2003).

Quando cultivados *in vitro*, a morfogênese e os aspectos culturais dos basidiomicetos são afetados por vários fatores ambientais, como luminosidade, aeração, temperatura, umidade e condições nutricionais. *G. lucidum* desenvolve-se bem em escuridão, em sombra ou em iluminação difusa, sendo a escuridão o ponto indicado para germinação do esporo e desenvolvimento do micélio. Para a produção do corpo de frutificação, a luz é indispensável para garantir a qualidade do produto. A luz direta em momento algum é recomendada, pois pode causar aborto dos primórdios (WILLARD, 1990).

Culturas miceliais de *Ganoderma* inoculadas em meio BDA (batata, dextrose e ágar), quando incubadas à temperatura ótima, desenvolvem colônias brancas ou amarelo-pálidas, tornando-se mais amarelas e com aspecto floculoso, em exposição à luz. As culturas *in vitro* produzem diferentes estruturas de hifas, como geração de conexões entrelaçadas, hifas com aspecto de fibra, hifas esqueléticas e hifas em roseta. Em alguns casos de cultivos, o crescimento micelial pode ser inibido pela luz ou apresentar feitiços, como setorização, pigmentação, formação de primórdio do corpo de frutificação e estruturas frutificantes atípicas, originando basidiósporos, porém sem desenvolvimento de basidiocarpo (**Figura.4**) (ADASKAVEG; GILBERTSON, 1989)



Figura 4.-Imagens do micélio de *Ganoderma lucidum*, em meio de cultivo artificial de laboratório. Fonte: o autor (2019).

O gênero *Ganoderma* inclui fungos em sua maioria saprófitas ou decompositores de madeira, atuando sobre a degradação da lignina, celulose e hemicelulose. Assim, podem ser encontrados em uma grande variedade de árvores mortas ou debilitadas. Também é encontrado em tocos, geralmente próximo à interface do solo e ocasionalmente em solos sobre raízes (DAI et al., 2009). Algumas espécies deste gênero podem ser consideradas como patógenos de plantas, pois causam prejuízo, afetando a produção de borracha, chá, café, cacau, entre outras culturas. Contudo, a capacidade de degradar lignina e celulose também confere a essas espécies uma importante função ecológica, como decompositoras de árvores mortas (BUCHANAN, 2001).

Esse fungo é estudado por muitos pesquisadores, e recebe atenção especial por parte da indústria, por se tratar de um modelo em potencial para investigar o complexo mecanismo de regulação de vias metabólicas secundárias em basidiomicetos superiores (GU et al., 2018). Também em razão do seu amplo uso na medicina, sendo popularmente usado contra um grande número de doenças, como câncer, problemas hepáticos, doenças cardiovasculares, inflamações, hipertensão, alguns problemas neurológicos, entre outros (ZHOU et al., 2012; ZONG et al., 2012).

Grande número de compostos químicos podem ser extraídos do corpo de frutificação, micélio e esporos. Muitos polissacarídeos e triterpenos, extraídos desse cogumelo exibem efeitos quimiopreventivos e/ou tumoricidas, como comprovado por numerosos estudos de experimentos *in vitro* e estudos *in vivo* em animais e humanos

(YUEN; GOHEL, 2005). Os exopolissacarídeos (EPS obtidos através do seu desenvolvimento por cultivo submerso), quando testados frente a várias linhagens de células cancerosas humanas, exerceram efeito inibidor de até 80%. Dietas suplementadas com *G. lucidum* preveniram a carcinogênese induzida em camundongos (LU et al., 2003).

Em razão dos seus benefícios à saúde humana, numerosos produtos de *G. lucidum*, preparados a partir de diferentes partes do cogumelo estão atualmente disponíveis no mercado em muitas formulações, como em pó, cápsulas, esporos coletados dos corpos de frutificação, micélio seco em pó colhido a partir de cultivo em meio líquido em tanques de fermentação, preparações secas e em pó de substrato. São encontrados em bebidas como cervejas, café solúvel, chás, em produtos cosméticos como tônico capilar e loções e até como arranjo ornamental, simbolizando felicidade, sorte e saúde (BLOOMBERG BUSINESS, 2013).

Com o crescente valor comercial deste fungo, a necessidade de desenvolver estudos básicos sobre o seu desenvolvimento e regulação está se tornando ainda mais evidente, bem como estudos que testem o potencial de suas substâncias bioativas no controle de fitopatógenos de interesse agrônômico.

2.2.1 Produção e cultivo

Nos séculos passados, o cultivo de cogumelos medicinais era realizado pelos japoneses sob troncos em decomposição; os chineses, em madeira e palhas decompostas; os europeus em bosques ou ao ar livre. Esses processos necessitam de longos períodos para o desenvolvimento do cogumelo. Atualmente, a pesquisa científica modificou todo o contexto de cultivo (**Figura 5**), tornando a produção comercial destes fungos cada vez maior (URBEN et al., 2017).

O interesse na produção de cogumelos é crescente, pois estes organismos podem converter o enorme desperdício de biomassa lignocelulósica em alimento humano, além de serem capazes de produzir notáveis produtos nutracêuticos e medicinais com benefícios múltiplos para a saúde. O cultivo de *G. lucidum* pode ser feito por meio de três técnicas: cultivo em toras de madeira, cultivo em sacos ou potes e cultivo em meio líquido. O cultivo submerso pode ser realizado em tanques biorreatores. A escolha do método de cultivo dependerá do objetivo da produção,

isto é, corpos de frutificação e esporos ou apenas o micélio (GURUNG; BUDATHOKI; PARAJULI, 2013).

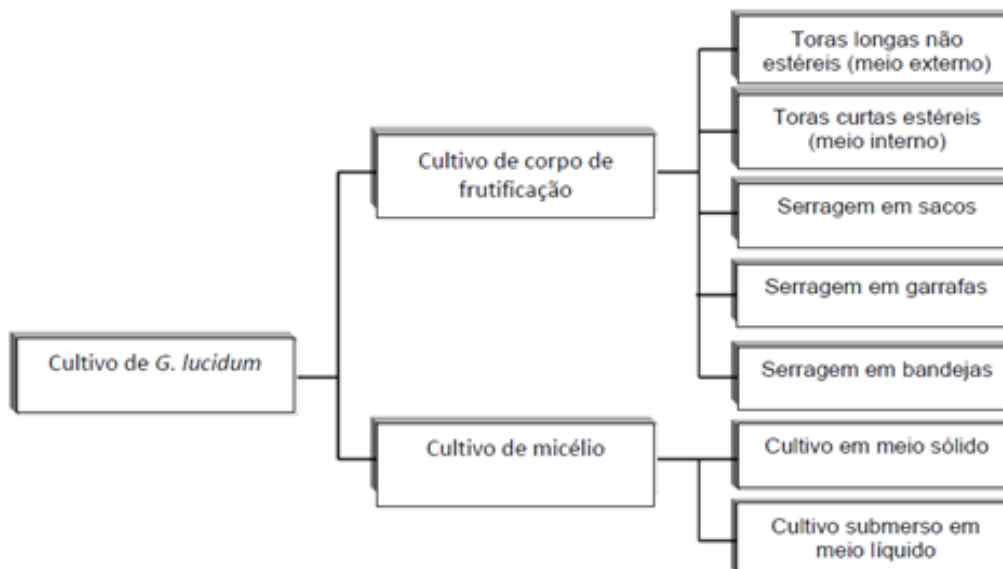


Figura 5- Métodos de cultivo para produção de *G. lucidum*. Fonte: Berovic et al. (2012), adaptado por Atoji-Henrique (2015).

O cultivo de *G. lucidum* atrai a atenção de pesquisadores que trabalham com bioprospecção de substâncias bioativas. Os processos industriais de cultivo em substratos sólidos, incluindo fermentação em grãos úmidos, apresentam inúmeras restrições, pois compreendem processos demorados, com altos custos de produção e que apresentam problemas para aumento de escala produtiva, além da grande suscetibilidade à contaminação por fungos e bactérias (SRIRAM et al., 2011).

Uma vez que são necessários vários meses para cultivar o corpo frutífero de *G. lucidum*, o cultivo submerso de micélio assume importância, dado que estudos relatam que o micélio contém os mesmos compostos bioativos e em concentrações similares aos corpos de frutificação, além do tempo para produção ser bem menor. A fermentação submersa é um processo que ocupa espaços reduzidos, o que a torna vantajosa no sentido de barateamento de custos e diminuição das chances de contaminação. Esse cultivo é realizado em biorreatores, frascos erlenmeyer agitados ou não, garrafões, biorreatores de bancada ou fermentadores em escala industrial (**Figura 6**) (RUBEL, 2006).



Figura 6- Cultivo de micélio de *Ganoderma lucidum* em meio líquido (A) em erlenmeyer; (B) em biorreator Fonte: (A) o autor (2019); (B) Petre e Petre (2013).

Outra vantagem do cultivo submerso é a possibilidade de controlar variáveis físico-químicas, como temperatura, densidade, morfologia do inóculo, pH, pressão osmótica, taxa de agitação e de aeração. A composição do meio de cultura e as concentrações iniciais dos açúcares também atuam de forma decisiva sobre o processo fermentativo (FANG; TANG; ZHONG, 2002). Através desse método é possível extrair substâncias de interesse como os endopolissacarídeos (polissacarídeo intracelular - IPS), a partir da biomassa micelial, e exopolissacarídeos (polissacarídeo extracelular - EPS) isolados do caldo de cultivo, que são biomoléculas de grande interesse farmacológico (RUBEL, 2006).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros formados por unidades repetidas de açúcares que são secretados no meio e fazem parte da matriz extracelular. Têm como função proteger as hifas da desidratação e oferecer suporte às enzimas secretadas, mantendo um ambiente propício à digestão e absorção de nutrientes. Também são constituintes importantes da parede celular, chegando a compor 75 % da mesma e conseqüentemente sendo responsáveis por boa parte da biomassa total do fungo (GUTIÉRREZ et al., 1995). As características dos EPS dependem da qualidade dos monômeros que os formam, dos tipos de ligações e níveis de ramificações existentes. Essas características, por sua vez, dependem do meio onde o fungo cresce e de fatores como pH, fontes de carbono e de nitrogênio (GUTIÉRREZ et al., 1995; GERN et al., 2008).

Estudos têm buscado formas de melhorar a produção em meio líquido, testando composições do meio, alterando componentes, condições de cultivo,

volume, quantidade de inóculo e formas de eliciação para a estimulação de metabólitos bioativos (WAGNER et al., 2003).

Yang e Liao (1998) relataram a produção de polissacarídeo por *G. lucidum* em cultura submersa a uma temperatura ótima entre 30 e 35° C e pH ideal de 4 a 4,5. Segundo os autores, a agitação e aeração do caldo de cultivo influenciaram de forma benéfica a secreção do polissacarídeo. Fang e Zhong (2002) testaram os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e glicose no cultivo submerso de *G. lucidum*. Obtiveram aumento na produção de EPS em altas concentrações iniciais de glicose, porém a produção de biomassa foi baixa. Segundo os autores, a alta osmolaridade do meio é um fator de estresse para as células, levando à inibição do crescimento celular e ao aumento na produção de polissacarídeo, como forma de defesa.

Também uma estratégia de irradiação de luz em três estágios foi desenvolvida em cultura submersa sobre *G. lucidum* para a produção eficiente de metabólitos bioativos. Foram testadas: luz azul (390-500 nm, λ (máx.) = 470 nm), luz vermelha (560-700 nm, λ (máx.) = 625 nm) e luz branca (400-740 nm, λ (máx.) = 550 nm). Os melhores resultados obtidos na produção de metabólitos foram atingidos com irradiação de luz em três estágios. O primeiro estágio foi a cultura escura de dois dias; a segunda fase foi a cultura de irradiação de luz branca de 0,94 W / m² de seis dias, e a terceira fase foi de 4,70 W / m² de cultura de irradiação de luz branca até ao final da fermentação. Com essa pesquisa os autores concluíram que o ambiente escuro no início do processo de fermentação é favorável à biossíntese específica de ácido ganodérico (GA), contudo depois disso o ideal foi irradiação de luz branca (ZHANG; TANG, 2008).

Tang e Zhong (2002) relatam um processo de fermentação submersa em biorreatores agitados e frascos de 250 mL. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção de GA e polissacarídeos por *G. lucidum* quando submetido a diferentes fontes de carbono (sacarose, maltose, lactose e glicose). A sacarose aumentou a produção do EPS, IPS e GA e diminuiu o crescimento celular. Lactose propiciou aumento de produção de biomassa, GA e de endopolissacarídeo. Porém, com o aumento da concentração houve diminuição de GA, sendo que a sua produção foi estimulada pela adição de pequenas quantidades ao decorrer do cultivo submerso (*pulse feeding*).

Lee et al. (1999) obtiveram aumento na produção de EPS através do controle de pH em dois estágios. O cultivo iniciou com pH 3 até atingir a fase exponencial de

crescimento e a seguir foi mantido em pH 6 até o final do processo. O controle de pH favoreceu a manutenção da morfologia micelial e diminuiu a viscosidade no sistema. Esta técnica pode aumentar grandemente a produção de EPS de 4,1 g para 20,1 g/L. Yang, Ke e Kuo (2000) estudaram o efeito da adição de ácidos graxos ao meio de cultivo de *G. lucidum*. O ácido oléico, na concentração de 0,15 g/100 mL, propiciou um aumento de biomassa de 0,20 g/100 mL para 0,46 g/100 mL, enquanto que o ácido palmítico aumentou a produção do polissacarídeo em 40%. Em outro trabalho, Huang et al. (2009), demonstraram que quando adicionados 2% de óleo de milho na cultura submersa de *G. lucidum*, há um aumento de biomassa micelial e EPS. Os óleos vegetais podem estar estimulando e modificando a composição da membrana e aumentando a permeabilidade, ou afetando diretamente o nível de síntese das enzimas envolvidas na produção de polissacarídeos por *G. lucidum* (YANG; KUO, 2000).

A fermentação submersa de fungos superiores é caracterizada por um aumento na viscosidade do caldo com o tempo, seja em consequência do aumento da concentração celular, mudanças na morfologia microbiana ou pelo acúmulo de produtos extracelulares que alteram as características do caldo de fermentação. Após essas mudanças, haverá uma série de problemas que devem ser considerados e resolvidos, especialmente o suprimento de oxigênio. O oxigênio afeta o crescimento celular, a morfologia celular, a absorção de nutrientes e a biossíntese de metabólitos (ZHONG; TANG, 2004).

Tang e Zhong (2002) propuseram um processo de fermentação de dois estágios para aumentar a produção de GA, combinando a fermentação convencional em frasco agitado com cultura estática. Uma densidade celular elevada de 20,9 g de DW / L (DW = peso seco de células) foi alcançada através de uma fermentação em frascos agitados de 4 dias seguida por uma cultura estática de 12 dias.

A morfologia e estrutura macro e microscópica de *G. lucidum* são bastante influenciadas por características do cultivo, como meio, agitação e adição de polímeros (que funcionam como suporte para o crescimento). A morfologia de *G. lucidum* é um fator importante que afeta as propriedades do caldo de fermentação e seu controle é altamente desejado do ponto de vista industrial (PARK et al, 2002).

Normalmente duas formas de crescimento em meio líquido de fungos são observadas: a forma de pellets ou granulada, geralmente menos viscosa, e o crescimento filamentosos (WAGNER et al., 2004). Pellets são caracterizados por

micélios em agregados estáveis, esféricos, consistindo de uma rede relativamente densa, ramificada e parcialmente entrelaçada de hifas (PARK et al., 2002). Uma série de pesquisas abordam os fatores que influenciam a morfologia de *G. lucidum* em meio líquido e como esta afeta a produção de EPS.

Yang, Yang e Chen (2009) testaram estratégias de agitação e adição de ágar para obtenção de maior quantidade de micélio em morfologia diminuída (*pellets* menores). Essa morfologia diminuída é desejável uma vez que pellets muito grandes sofrem uma autólise na sua região central devido a limitações de nutrição. Pellets menores (da ordem de 200 a 400 μm) são considerados ótimos já que a viscosidade permanece mais baixa e evita problemas de transporte de massa. O trabalho desses autores (**Figura 7**) mostra os diferentes tamanhos de pellets obtidos com a adição de polímeros ao cultivo submerso. A adição de ágar ao meio resultou em pellets mais homogêneos e com um tamanho menor (média de 2,5 milímetros) (YANG; YANG; CHEN, 2009).

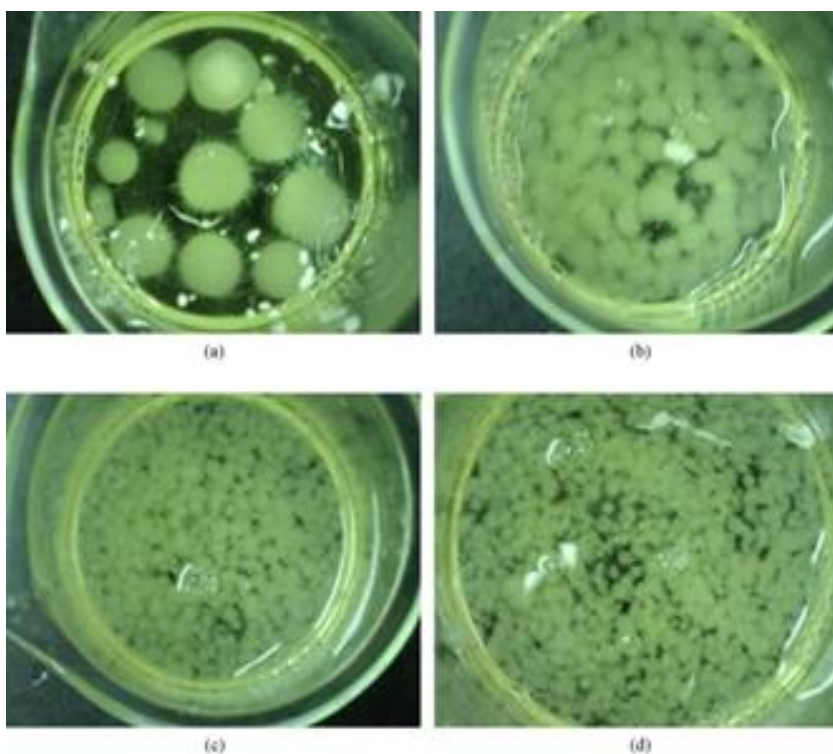


Figura 7-Tamanhos de pellets de *G. lucidum* obtidos com a adição de polímeros ao cultivo, visando a menor granulometria possível: controle (sem adição de ágar) (a); adição de 0,1% de ágar (b); adição de 0,2% de ágar (c); adição de 0,4% de ágar (d). Fonte: Yang, Yang e Chen (2009).

Fang, Tang e Zhong (2002) relataram que pellets menores estão ligados também a uma maior produtividade de polissacarídeo. Esses autores determinaram que a taxa de inóculo também é significativa para a produtividade de polissacarídeo, crescimento de micélio e acúmulo de ácidos ganodéricos. Testaram uma faixa de inóculo de 70 a 670 mg/l (em termos de massa seca) e obtiveram a máxima concentração celular (15,7 g/l em termos de peso seco) com uma concentração de inoculação de 330 mg/l.

Wan et al. (2016) estudaram morfologia do micélio de *Ganoderma lucidum* abordando uma estratégia de fermentação em lotes repetidos (RBF), envolvendo a substituição repetida de uma porção da cultura por uma nova amostra. Isso não apenas evita a repressão catabólica resultante de altas concentrações de substrato, mas também reduz significativamente o tempo de fermentação.

Wagner et al. (2004) estudaram a ligação entre morfologia e fisiologia de *Ganoderma lucidum*, em cultivo submerso contendo peptona, extrato de levedura e glicose. Nas pré-culturas os eventos morfológicos e metabólicos demonstraram estar ligados, ou seja, os pellets originalmente produziam protuberâncias quando a glicose estava presente no meio, embora a glicose não fosse consumida. As protuberâncias foram então liberadas no meio como pelotas de segunda geração, quando o consumo de glicose começou e a taxa de produção de exopolissacarídeo (EPS) aumentou. A sincronia entre eventos foi repetida em culturas alimentadas com glucose ou peptona e extrato de levedura. Foi demonstrado que as mudanças morfológicas estão relacionadas à produção de EPS. Conforme mencionado pelos autores, *G. lucidum* cresceu com morfologia de pellets em cultura padrão, e foi se modificando ao decorrer do tempo (**Figura 8**). No dia 7 de cultivo, grânulos originais, referidos como grânulos de primeira geração, tinham formas de esferas regulares com hifas compridas saindo de sua superfície (**Fig. 8 a e b**). No dia 9, as longas hifas deram origem a protuberâncias (**Fig 8 c e d**), que aumentaram em comprimento e largura, dando ao pellet uma aparência de explosão (**Fig. 8 e**). No dia 13, essas protuberâncias começaram a se desprender dos pellets de primeira geração (**Fig. 8 f**), que no dia 17 tinham quase completamente quebrado. Estas protuberâncias destacadas, a seguir designadas por pellets de segunda geração, apresentavam uma aparência de penas no momento da libertação, embora não fossem planas. No dia 20, eram maiores e de forma ovóide (**Fig. 8 g e h**). Neste trabalho a sincronia entre os eventos durante a pré-cultura foi impressionante: o início do consumo de

glicose e o início da produção rápida de EPS estavam ligados à liberação dos pellets de segunda geração (WAGNER et al., 2004).

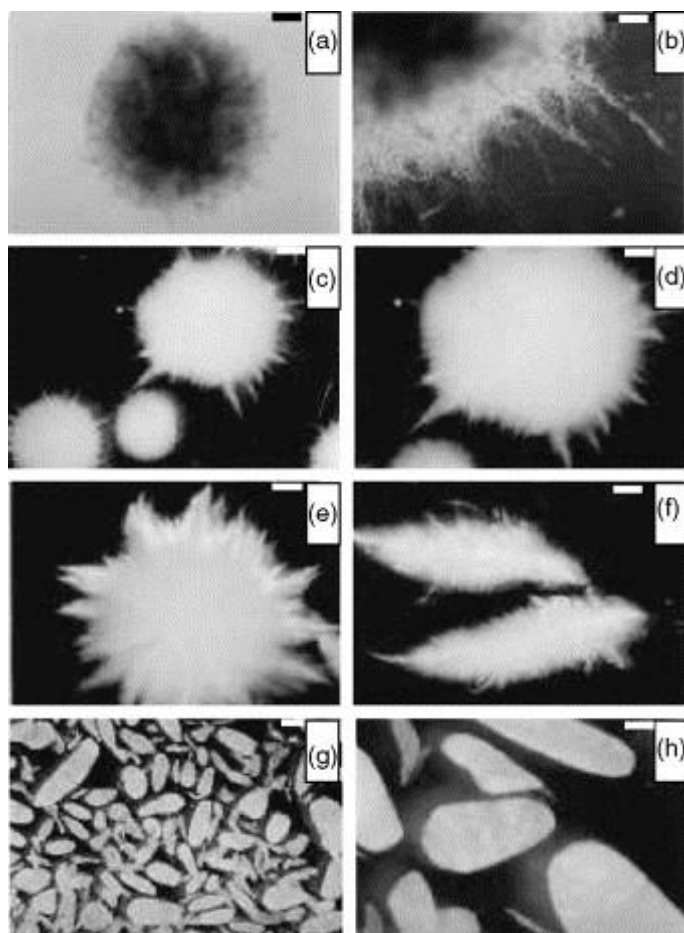


Figura 8- Desenvolvimento de pellets na pré-cultura de *Ganoderma lucidum* . (a) dia 7, escala bar = 0,25 mm; (b) dia 7, escala bar = 0,1 mm; (c) dia 9, escala bar = 1,5 mm; (d) dia 9, escala bar = 1,0 mm; (e) dia 13, escala bar = 1,5 mm; (f) dia 13, escala bar = 0,8 mm; (g) dia 20, escala bar = 1,5 mm, (h) dia 20, escala bar = 0,3 mm..Fonte: Wagner et al. (2004).

Embora a produção substâncias bioativas possa ser melhorada pela otimização do processo de cultivo em meio líquido, o rendimento de metabólitos secundários ainda é muito baixa. Desta forma, os eliciadores são compostos que estimulam a defesa do organismo e podem desempenhar papéis importantes no aumento da via biossintética para a produção melhorada de compostos bioativos secundários comercialmente importantes (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

2.2.2 Compostos biologicamente ativos

Ganoderma lucidum é muito estudado em relação às suas propriedades bioativas e seus inúmeros efeitos benéficos, como ação antibacteriana, antioxidante e antitumoral, entre inúmeros outros (WASSER, 2002; HELENO et al., 2013; LI et al., 2012; ZHONGHUI et al., 2013). Pesquisas apontam que todos estes efeitos são devidos à ação sinérgica de vários componentes diferentes. Ou seja, a ação observada não decorre de apenas uma substância quimicamente ativa mas da ação de várias substâncias, como polissacarídeos, triterpenos, esteróis, adenosina, nucleotídeos, lectinas e outras proteínas (WASSER, 2014).

Mais de 240 compostos secundários já foram isolados dos corpos frutíferos e micélio deste fungo (CHEN et al., 2012; GU et al., 2018). Os principais constituintes ativos produzidos são β -D-glucana, o ácido ganodérico e a proteína Ling Zhi-8 (URBEN et al., 2004). Além disso, numerosas isoenzimas de lacase que possuem numerosas isoenzimas de lacase que possuem capacidades ligninolíticas também foram identificadas (PATERSON, 2006; BAO; DONG; FANG, 2000).

As proteínas bioativas são relatadas por contribuírem para as propriedades medicinais de *G. lucidum*, incluindo LZ-8, uma proteína imunossupressora purificada do micélio (VAN DER HEM et al., 1995); e uma proteína antifúngica chamada de ganodermina, que foi isolada de corpos frutíferos de *G. lucidum* (WANG; NG, 2006).

Óleos voláteis também foram relatados em espécies de *Ganoderma*. Óleo volátil foi isolado dos corpos de frutificação de *G. lucidum* por hidrodestilação e caracterizado por cromatografia gasosa GC-FID (detector por ionização em chamas) e GC-MS (espectro de massas). Dos 65 constituintes identificados no óleo essencial de *G. lucidum*, os principais foram trans-anetol (9,1%), R - (-) - linalol (4,4%), S - (+) - carvona (4,4%), 2-pentilfurano (2,8%), α -terpineol (2,7%) e n-nonanal (2,3%) (ZIEGENBEIN et al., 2006).

Os representantes dos filos Ascomycota e Basidiomycota são fungos que apresentam múltiplos papéis ecológicos (existem espécies saprofíticas, endofíticas, patogênicas, parasitas e simbióticos - micorrizas) e podem produzir polissacarídeos. Os polissacarídeos produzidos desempenham diferentes funções biológicas: atuam na proteção contra fatores de stress ambiental e na interação com outros organismos. Polissacarídeos de ascomicetos e basidiomicetos são conhecidos por

suas propriedades antioxidantes, imunoestimulantes, antitumorais e antimicrobianas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015).

Os polissacarídeos com atividade biológica são amplamente encontrados entre fungos e bactérias, sendo que a maioria destas macromoléculas pode compartilhar uma única estrutura em espécies diversas, porém com propriedades distintas. Podem ser encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros, glicoproteínas, peptídeoglicanas e lipopolissacarídeos (GOW/ GADD, 2007). Podem desempenhar inúmeros papéis, tais como: polímero de reserva, composição da estrutura da parede celular, entre outros. Os polissacarídeos de *G. lucidum* apresentam uma ampla gama de bioatividades, incluindo efeitos anti-inflamatórios, hipoglicêmicos, antiulcerosos, antitumorigênicos e imunoestimuladores (BAO et al., 2001).

Os principais polissacarídeos isolados, β -1-3 e β -1-6 D-glucanos, formam em torno de 46% da massa da parede celular. Todas as glucanas são polímeros de glicose, unidas por ligações glicosídicas, e que se diferenciam conforme o tamanho e as estruturas de ramificação (YUEN; GOHEL, 2005). As β -glucanas são as formas mais abundantes de polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de bactérias e fungos.

De acordo com as características do polissacarídeo, a seleção de um método de extração é muito importante; baseia-se na estrutura e na solubilidade em água do polissacarídeo e depende especialmente da estrutura da parede celular. O princípio básico é quebrar a parede celular da camada externa para a camada interna sob condições de extração leve à forte (pH e temperatura). Com base nesse princípio, a maioria dos polissacarídeos é extraível com água quente, ou soluções alcalinas, ácidas, salinas e diluídas, ou com dimetilsulfóxido (ZHANG et al., 2007).

Os triterpenos são uma subclasse de terpenos, hidrocarbonetos constituídos por unidades de isoprenos que são naturalmente produzidos por plantas. Estes compostos são amplamente distribuídos por todo o mundo vegetal e são encontrados em procariontes e eucariontes. Mais de 50 triterpenos exclusivos do *G. lucidum*, denominados ácidos ganodéricos e lucidênicos, já foram identificados (YUEN; GOHEL, 2005). Os principais isolados são do tipo lanostano (ácidos ganodêrmicos, ácidos lucidônicos), meroterpenóides, esteróides e seus diversos derivados (BABY; JOHNSON; GOVINDAN, 2015) (**Figura 9**).

Os ácidos ganodéricos possuem atividades farmacológicas comprovadas, como atividade antioxidante, antitumoral, antiviral, hepatoprotetora, hipocolesterolêmica, entre outras. Cerca de 130 já foram isolados e caracterizados a partir de corpos de frutificação, micélio e esporos de *G. lucidum* (PATERSON, 2006; YOU et al., 2013).

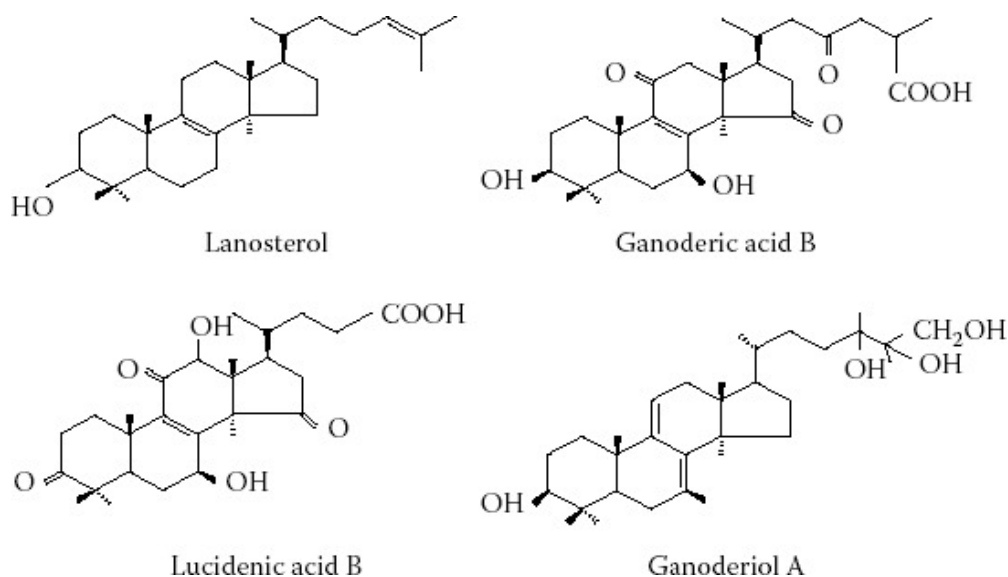


Figura 9- Estrutura química do lanosterol e três dos muitos triterpenos isolados de *Ganoderma lucidum*. Fonte: Kubota et al. (1982).

A biossíntese dos triterpenóides ocorre pela via do mevalonato, com a biossíntese de ácidos ganodéricos a partir do lanosterol, por uma série de reações de oxidação-redução, hidroxilação e acetilação (YOU et al., 2013). A estrutura química de um triterpeno é baseada no lanosterol (**Figura 9**), um importante intermediário que permite a diversidade estrutural dos ácidos ganodéricos (PATERSON, 2006).

Embora o cultivo de fungos possa ser otimizado por fatores físicos e controlada em biorreatores para produção de metabólitos secundários e substâncias de interesse, a elicitação é a principal estratégia para melhorar a produtividade de substâncias bioativas em culturas miceliais (GU et al., 2018). O uso de elicitores é baseado no mecanismo de indução de produção de metabólitos secundários em plantas que pode ser aplicado em fungos, como o *G. lucidum* (ZHU et al., 2008).

2.2.3 Atividade Antimicrobiana

Este fungo tem sido amplamente estudado por suas propriedades terapêuticas. Pesquisas em relação a sua ação antifúngica e antibacteriana frente a espécies patogênicas são escassas. Porém estudos já demonstram seu potencial antibacteriano inibindo o crescimento e em alguns casos matando bactérias patogênicas (GAO et al., 2003). Skalicka-Woźniak et al. (2012), estudaram a atividade antibacteriana dos polissacarídeos de *G. lucidum in vitro* pelo método de micro-diluição em caldo (CIM). Oito estirpes bacterianas de referência foram utilizadas. Todas as amostras de polissacarídeo testadas mostraram amplo espectro e atividade antibacteriana moderada. A cepa de *Micrococcus luteus* foi a mais sensível com CIM de 0,63 - 1,25 mg / mL.

Kamble, Venkata e Gupte (2011) estudaram atividade antimicrobiana dos extratos obtidos do micélio de *G. lucidum*. Micélios secos foram extraídos em diferentes solventes como metanol, acetona, clorofórmio e água destilada, separadamente, usando o aparelho Soxhlet. Esses extratos foram testados para o controle de organismos Gram-positivos e Gram-negativos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium difteria*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas*. Os quatro extratos na concentração de 100 mg/ ml apresentaram inibição dos microrganismos.

Em outro estudo, os polissacarídeos de *G. lucidum* foram extraídos com água fervente e testados quanto à atividade antimicrobiana contra três fitopatógenos (*Erwinia carotovora*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*) e cinco microrganismos relacionados à alimentação humana e infecções alimentares (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus nigricans*) pelo método de difusão em ágar. O extrato apresentou efeito inibitório sobre *E. carotovora*, um fraco efeito inibitório sobre *P. digitatum*, e não apresentou efeito sobre *B. cinerea* e para os demais patógenos de plantas. Em relação aos demais microrganismos, o extrato apresentou efeito inibitório sobre *B. subtilis* e *B. cereus*, efeito inibitório fraco sobre *E. coli* e *A. niger* e não apresentou efeito sobre *R. nigricans* (BAI et al., 2008). Heleno et al. (2013) também relataram as propriedades antibacterianas, antifúngicas e também demelanizadoras de polissacarídeos de *G. lucidum*, extraídos com metanol.

Wang e Ng (2006) isolaram uma proteína antifúngica de corpos frutíferos do cogumelo *G. lucidum* chamada ganodermina. O procedimento de isolamento utilizou cromatografia em DEAE-celulose, gel azul Affi-gel, CM-Sepharose e Superdex 75. Essa proteína inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Physalospora piricola*, com um valor de IC 50 de 15,2 μM , 12,4 μM e 18,1 μM , respectivamente.

Sajeena e Marimuthu (2013) testaram uma formulação isolada de *Ganoderma* sp. (Ganosol 10EC a 0,25%), que apresentou efeito no controle de crescimento de patógenos *in vitro*. Foi testada sob condições de estufa como pré-inoculação. Esse extrato foi eficaz, inibindo o crescimento micelial da requeima da bainha em plantas de arroz, causada por *Rhizoctonia solani*. A aplicação com pré-inoculação da formulação reduziu 63,62% na quantidade de lesão causada pelo patógeno.

Um composto chamado de G_app7, que foi isolado de *Ganoderma applanatum*, apresentou atividade anti-oomiceta semelhante à estrobilurina. Esse composto foi eficiente na inibição do crescimento e desenvolvimento do míldio causados por *Sclerospora graminicola* em milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). O tratamento de sementes com G_app7 resultou em um aumento significativo na proteção contra doenças (63%) em condições de casa de vegetação, em comparação com o controle, que foi água (JOGAIAH et al., 2016).

Ganoderma pfeifferi produz um grupo de hidroquinonas conhecidas como ganomicinas (Ganomycin A e B). Esses compostos inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e também apresentam efeito inibitório sobre vários fungos e bactérias (GETHA et al., 2009; MOTHANA et al., 2000; LINDEQUIST; JULICHM; WITT, 2015). Smânia et al. (2003) isolaram três esteróides e cinco triterpenos do fungo *Ganoderma annulare* que foram fortemente efetivos contra os fungos *Microsporum canis* e *Trychophyton mentagrophytes*.

2.2.4 Eliciação e produção de metabólitos secundários

Várias pesquisas são realizadas para elevar a produtividade de compostos bioativos de fungos em meio líquido. O uso de elicitores é baseado no mecanismo de indução da produção de metabólitos secundários em plantas, que pode ser

aplicado em fungos (ZHU et al., 2008). Os elicitores são utilizados em meio líquido, pois aumentam a intensidade das respostas das células às tensões bióticas e abióticas com síntese aumentada de compostos de sinal e subsequente influência na produção de metabólitos secundários (MISHRA; SHARMA; MISRA, 2012). Por vezes, a adição de elicitores torna o processo mais rápido e eficiente, levando à produção de substâncias-alvo.

Os fungos produzem metabólitos secundários para facilitar sua interação com o ambiente e estabelecer mecanismos de defesa. Elicitores são compostos capazes de estimular a defesa de um organismo, através da ativação da transdução de sinal após a percepção eliciadora, o que resulta na reprogramação do metabolismo celular, envolvendo grandes mudanças na atividade gênica (MURTHY; LEE; PAK, 2014). A elicitação é vista como a principal estratégia para melhorar a produtividade de compostos bioativos em culturas miceliais.

Estudos mostraram correlação positiva entre a adição de eliciadores e o acúmulo de compostos bioativos, e pesquisas atuais estão sendo conduzidas para explicar como tais sinais induzem a biossíntese para formação desses compostos (SHI et al., 2010).

Uma das formas de elicitação é a utilização de microrganismos competidores, vistos como um fator biológico capaz de estimular a produção de enzimas com potencial bioativo. Microrganismos contaminantes são comuns no cultivo *in vitro*. Os contaminantes mais comuns, segundo Lin e Lin (1999) que aparecem nos substratos de *G. lucidum* são *Penicillium digitatum* e *Trichoderma* spp. (**Figura 10**)



Figura 10-Ação antagonista de *Ganoderma lucidum* a fungos contaminantes observados *in vitro*. Fonte: o autor (2019).

Zhu, Zhong e Tang (2008), a fim de aperfeiçoar a produção e melhorar a produtividade de metabólitos bioativos, testaram diferentes elicitores fúngicos na

fermentação submersa de *G. lucidum* para identificar um elicitor ótimo. Testaram três maneiras de preparar bioelicitores de três diferentes componentes isolados de micélios fúngicos. Os fungos usados foram *Tuber sinense*, *Tuber aestivum* Vittad. e *Tuber melanosporum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os elicitores reduziram o crescimento micelial de *G. lucidum*, no entanto houve aumento sobre a produção de EPS, IPS e do ácido ganodérico como forma de defesa. Os melhores resultados foram obtidos com os elicitores de *T. aestivum vittad*, *T. sinense* e *P. citrinum*. Este trabalho demonstrou que os elicitores fúngicos podem contribuir para a síntese de metabólitos secundários.

Outros compostos também foram testados. O ácido salicílico (AS) é um hormônio vegetal que está envolvido na resistência a doenças em plantas em resposta a vários ataques patogênicos e que também pode induzir a biossíntese de metabólitos secundários em fungos. No entanto o mecanismo pelo qual o AS regula o metabolismo secundário de *G. lucidum* permanece incerto (LIU et al., 2018). Em um primeiro estudo realizado por Cao et al. (2017), a adição de AS em meio líquido promoveu o acúmulo de metabólitos secundários. Estes autores citam que o uso do AS pode fornecer um método conveniente, novo e adequado para melhorar o acúmulo de substâncias bioativas de fungos em meio líquido através da alteração e ativação de rotas metabólicas.

Em trabalho realizado por Lui et al. (2018), o tratamento com AS aumentou a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) através de diferentes vias em *G. lucidum*. Por um lado, o AS induz uma explosão oxidativa de ROS através do complexo NADPH-oxidase (NOX), que são enzimas transmembranares que estão localizadas em organelas intracelulares. Por outro lado, o AS inibe a atividade do complexo da mitocôndria III e esse efeito desempenha um papel importante na diminuição da frequência respiratória. Os autores descobriram que a diminuição na taxa respiratória mitocondrial induzida por AS ajuda a regular o acúmulo de ROS. Em resumo, em *G. lucidum* o AS inibe a atividade do complexo III para aumentar os níveis de ROS, os quais estão envolvidos na regulação da biossíntese de ácido ganodérico. Esse fenômeno interessante indica que os hormônios vegetais podem induzir a biossíntese de metabólitos secundários em fungos. No entanto, o mecanismo pelo qual o AS regula o metabolismo secundário de *G. lucidum* ainda permanece incerto (LIU et al., 2018). **(Figura 11)**

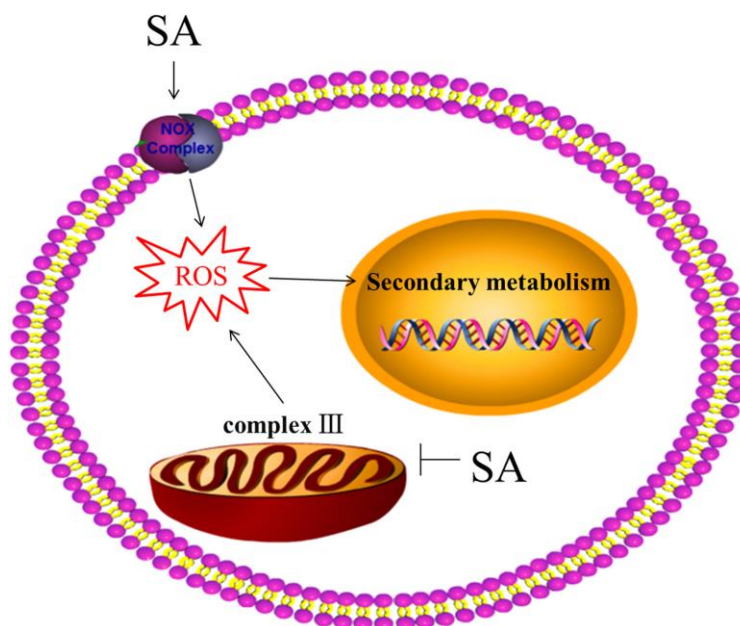


Figura 11-Representação esquemática da potencial cascata de eventos celulares que constituem a via de sinalização de ROs mediada por AS. Fonte: Liu et al. (2018).

O *G. lucidum* pode ser classificado como um basidiomiceto que degrada lignina, hemicelulose e celulose (nesta sequência), produzindo enzimas para degradação destes materiais, bem como liberando compostos de baixo peso molecular que permitem a atuação das enzimas liberadas pela hifas de seus micélios. Alguns pesquisadores estão elucidando a forma de degradação de madeira por basidiomicetos, visando principalmente à metabolização da lignina, que é um dos compostos indesejáveis na indústria de papel (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009).

A membrana celular destes fungos pode conter receptores que identificam moléculas que são sinais para a ativação e expressão de genes relacionados à biossíntese (ZHU; ZHONG; TANG, 2008). Considerando que o *G. lucidum* é um fungo que, na natureza, tem como principal substrato a madeira, sendo a lignina seu substrato inicial, compostos ricos em lignina podem atuar como elicitores para ativação e expressão de genes ligados ao crescimento e produção de compostos bioativos.

Nesse sentido, o uso de um padrão de lignina adicionado ao meio líquido como forma de eliciação, se torna uma abordagem interessante. Segundo os autores Yang e Liao (1998), a alta osmolaridade do meio é um fator de estresse para as células, levando à inibição do crescimento celular e ao aumento na produção de polissacarídeo, como forma de defesa. Zhang, Zhong e Geng (2014) testaram

celulase como elicitor. A produção de metabólitos secundários foi aumentada de 779,6 mg/l para 1334,5 mg /l em comparação com o controle. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a celulose é resultado da degradação de parede celular e portanto acionou o sistema de defesa do fungo através da despolarização da membrana e levou à produção e secreção rápida dos metabólitos (XU; ZHONG, 2012).

A eliciação de fungos em fermentação submersa é uma abordagem moderna e eficiente, e que necessita ainda muita investigação e estudo, mas pode vir a contribuir para extração de substâncias com potencial no controle de patógenos de interesse agrônômico.

2.3 Indução de Resistência em plantas

Em fitopatologia, doença é a exceção e não a regra. Explica-se pelo fato de existir grande gama de fitopatógenos na natureza, mas apenas uma pequena fração capaz de causar doença em uma dada espécie. A razão disto é que as plantas possuem resistência contra a maioria dos microrganismos (AGRIOS, 1997).

De uma maneira geral as plantas possuem mecanismos físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos. Além dos mecanismos pré-existentes, plantas possuem mecanismos que são ativados após o reconhecimento do patógeno, os quais envolvem a formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e espécies reativas de oxigênio (AGRIOS, 2005; GOZZO, 2003).

A resistência induzida define o processo ativo de resistência dependente de barreiras físicas e/ou químicas da planta hospedeira, ativado por agentes bióticos ou abióticos, os chamados agentes elicitores (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2008). Uma ampla variedade de agentes bióticos, incluindo, microrganismos (células ou metabólitos), extratos de plantas, cogumelos, algas, e agentes abióticos (soluções salinas, hormônios vegetais, produtos sintéticos), entre outros podem induzir local e sistemicamente resistência contra patógenos (WALTERS et al., 2013).

Um dos primeiros relatos no Brasil sobre a indução de resistência foi relatado por Moraes et al. (1976) em espécimes de *Coffea arabica* suscetíveis à *Hemileia*

vastatrix, que foram submetidos a tratamento com uma suspensão de urediniósporos inativados que as protegeram contra um desafio subsequente com o mesmo patógeno. No entanto, o mecanismo de ação protetora era desconhecido. A partir deste estudo, muitas pesquisas foram e continuam sendo realizadas a respeito do assunto, para melhorar a compreensão das respostas da planta na presença de agentes elicitores. Atualmente a indução de resistência é vista como um método promissor no controle de doenças.

Alguns fungos podem combater agentes patogênicos através da secreção de enzimas, tais como quitinases ou antibióticos, e pela competição por nutrientes, auxiliando no manejo de doenças. Nesse sentido, podem ainda atuar como indutores de resistência (PUNJA; UTKHEDE, 2003). Muitos cogumelos medicinais e comestíveis têm sido pesquisados, apresentando grande potencial em elicitar respostas de defesa em plantas, intensificando assim os estudos relacionados à sua extração e caracterização.

Em estudos pioneiros os autores Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Jr. (1999) relataram que extratos de basidiocarpos e do micélio de shiitake apresentam efeito antibiótico sobre microrganismos de plantas. O extrato aquoso de shiitake também reduziu significativamente a ocorrência da murcha bacteriana *Ralstonia solanacearum* (Smith) em tomate (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007). Di Piero (2003) também demonstrou que o cogumelo *Lentinula edodes* apresenta compostos que ativam as respostas de defesa em plantas e podem auxiliar no controle dos fitopatógenos como *Colletotrichum lagenarium*, *Passion fruit woodiness virus* e *Xanthomonas vesicatoria*. Piccinin (2000) demonstrou que os filtrados de estipe e micélio de *L. edodes* foram eficientes em reduzir o número de lesões locais e sistêmicas em folhas de maracujazeiro inoculadas com *X. axonopodis* pv. *Passiflorae*. O potencial dos resíduos dos cultivos dos cogumelos *Agaricus bisporus* e *Lyophyllum decastes* Sing. foi estudado no controle da sarna da macieira, oídio, mancha angular e antracnose do pepino (YOHALEM; NORDHEIM; ANDREWS, 1996). Plantas de pepino pulverizadas com extrato do substrato de *Lyophyllum decastes* e *Pleurotus eryngii* apresentaram redução nos sintomas causados pelos patógenos *Podosphaera xanthii*, *P. syringae* pv. *lachrymans* e *Colletotrichum orbiculare* (PARADA et al., 2012). Estudos do uso de extratos e filtrados de crescimento micelial de *Ganoderma* sp. são inexistentes na indução e resistência em plantas.

Diante do exposto, percebe-se que a ativação dos mecanismos de defesa latente das plantas proporciona uma rápida e eficiente resposta frente ao uso de extratos de cogumelos ao ataque de fitopatógenos. O conhecimento dos processos biológicos que levam à doença e de como os organismos se comportam durante as interações com seus hospedeiros é crucial para propor novos modelos de estratégia de controle de doenças.

2.3.1 Como as plantas percebem e se defendem dos patógenos

Para um patógeno atacar um hospedeiro ele deve vencer seu sistema de defesa e conhecemos pelo menos duas maneiras pelas quais isto pode acontecer: o patógeno se “disfarça” para evitar ser reconhecido pela planta ou ele “sabota” seu sistema de defesa (DANGL; JONES, 2001). Em contrapartida, as plantas possuem mecanismos sofisticados para detectar a multiplicidade de agentes patogênicos presentes em seu ambiente e para ativar sua defesa na presença de determinados microrganismos. As interações planta-patógeno são controladas por um sistema imune de múltiplas camadas, que é ativado pelo reconhecimento do patógeno no hospedeiro (BOLLER, 1995).

Enquanto patógenos estão evoluindo com novos efetores para manipular o hospedeiro para sua vantagem, plantas estão evoluindo novas moléculas de reconhecimento, sugerindo uma co-evolução dinâmica contínua em ambos os lados da interação planta-patógeno. Os mecanismos pelos quais as plantas reconhecem uma molécula do patógeno (denominada PAMP- “*pathogen associated molecular pattern*” ou MAMP- “*microbe associated molecular patterns*”), envolvem a identificação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e efetores (BOLLER, FELIX, 2009).

Existem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que atuam como 'antenas' celulares e permitem que as plantas detectem uma ampla gama de sinais de perigo, incluindo não-próprios (PAMPs, MAMPs, HAMPs e VAMPs - patógeno, micróbio, herbívoros e padrões moleculares associados a vírus) e até mesmo compostos auto-derivados (padrões moleculares associados a danos ou DAMPs), que são liberados no ataque de herbívoros e patógenos (BOLLER; FELIX, 2009).

Os PAMPs são estruturas ou moléculas exclusivas de micróbios que são conservados através de todas as classes de micróbios, incluindo microorganismos patogênicos e não adaptados (GOHRE; ROBATZEK, 2008). Entre os PAMPs detectados pelas plantas estão as flagelinas bacterianas (os principais componentes peptídicos do órgão de motilidade) (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000), lipopolissacarídeos (LPS, componente glicolípido da membranas externas de bactérias), fator de alongamento-Tu (uma proteína abundante na tradução de sinais), peptidoglicanos (PGN, um componente essencial do envoltório das células microbianas) e muropeptídeos liberados da PGN pela ação da lisozima (ASLAM et al., 2009), quitina fúngica, β -glucanas e ergosterol (principais constituintes da parede celular fúngica) (CHISHOLM et al., 2006).

O reconhecimento de PAMPs é realizado principalmente pelos receptores PRRs. Ainda se mantém incerto como ocorre seu mecanismo de interação. Estudos mostraram que estes receptores são proteínas transmembranares com LRR extracelular (repetição rica em leucina) e serina / treonina quinase intracelular, como o FLS2, um receptor da flagelina (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000) e o receptor EFR1 da EF-Tu, ambos de *Arabidopsis* (ZIPFEL et al., 2006).

Acredita-se que a resistência mediada por genes está associada à ativação de uma via de sinalização dependente de ácido salicílico (AS) que leva à expressão de genes relacionados à defesa, como PR1, a produção de ROS e a morte celular programada. Outros fito-hormônios envolvidos nas respostas dos patógenos são etileno (ET) e jasmonatos (JA). Para os patógenos biotróficos acredita-se que as respostas de defesa mediadas pelo gene R e a sinalização AS resultem em resistência, restringindo o crescimento de fungos em células infectadas que sofreram morte celular hipersensível. Por outro lado, a morte celular programada suporta o crescimento de patógenos necrotróficos. Assim, as respostas de defesa das plantas aparecem especificamente adaptadas ao patógeno atacante, com as defesas dependentes de SA atuando contra os biotróficos, e as respostas dependentes de JA e ET agindo contra os necrotróficos (GLAZEBROOK, 2005; JONES; DANGL, 2006).

Os efetores são moléculas patogênicas que manipulam a estrutura e função da célula hospedeira facilitando assim a infecção ou desencadeando respostas de defesa. Ao contrário dos termos “avirulência”, “elicitor”, “toxina” e “virulência”, o termo efetor não implica em um impacto negativo ou positivo no resultado da interação da

doença. Eles são responsáveis por promover a penetração nos tecidos e a persistência no hospedeiro, supressão das respostas imunitárias, permitindo o acesso a nutrientes, proliferação e crescimento (GOHRE; ROBATZEK, 2008; BOLLER; FELIX, 2009). Os efetores secretados atingem seu alvo celular na interface intercelular das células do hospedeiro e do patógeno (efetores apoplásticos) ou dentro das células do hospedeiro (efetores citoplasmáticos) (DJAMEI et al., 2011).

As plantas também possuem “autoindutores” como hormônios e constituintes estruturais. Quando hormônios vegetais, como ácido salicílico ou ácido jasmônico são aplicados exogenamente, é observada a ativação de genes de defesa (PASCHOLATI et al., 2010). Outros constituintes vegetais como os oligogalacturonídeos também são reconhecidos por receptores específicos no vegetal. Os galacturonídeos são constituintes estruturais da parede celular vegetal e são liberados pela ação de poligalacturonases produzidas por fitopatógenos (RESENDE et al., 2010). Esta molécula indutora de resistência, derivada do hospedeiro, é um exemplo de DAMP.

Em uma visão atual, o sistema de defesa das plantas pode ser representado como um modelo em “zigue-zague” de quatro fases (figura 6). Para Jones e Dangl (2006), o sistema de defesa da planta pode ser dividido em dois ramos. Um utiliza as vias de sinalização através de receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (PRRs) que respondem a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O segundo atua largamente no interior da célula, utilizando produtos protéicos polimórficos (NB-LRR) codificados pela maioria dos genes R. Estes produtos protéicos são nomeados após a sua ligação ao nucleotídeo (NB) característico e pela presença de domínios ricos em leucina repetidos (LRR). A resistência a doenças mediada por NB-LRR é eficaz contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, mas não contra os agentes patogênicos necrotróficos (JONES; DANGL, 2006).

Enquanto os fungos necrotróficos matam as células das plantas rapidamente após a infecção para se alimentarem do tecido morto, os fungos biotróficos adquirem nutrientes do tecido vegetal vivo. A relação biotrófica requer uma adaptação altamente especializada do patógeno à planta hospedeira (HAHN; MENDGEN, 2001). As hifas de fungos biotróficos podem crescer tanto intercelularmente como intracelularmente, sendo assim embebidas pela membrana plasmática da célula hospedeira. Muitos patógenos fúngicos biotróficos, como ferrugem e oídio, formam

estruturas de alimentação especializadas chamadas haustórios. Nessas estruturas, uma interface contendo carboidratos e proteínas é desenvolvida entre a parede da célula e a membrana plasmática da planta, o que facilita a troca de sinais e nutrientes entre fungos e hospedeiros (HAHN E MENDGEN, 2001; MENDGEN; HAHN, 2002).

As plantas desenvolveram sistemas de defesa multifacetados, muitos dos quais são induzidos apenas no ataque de patógenos. Estas respostas incluem a indução de genes relacionados com a patogênese (PR), a produção de metabólitos secundários, bem como o reforço da parede celular (DOEHLEMAN et al., 2008).

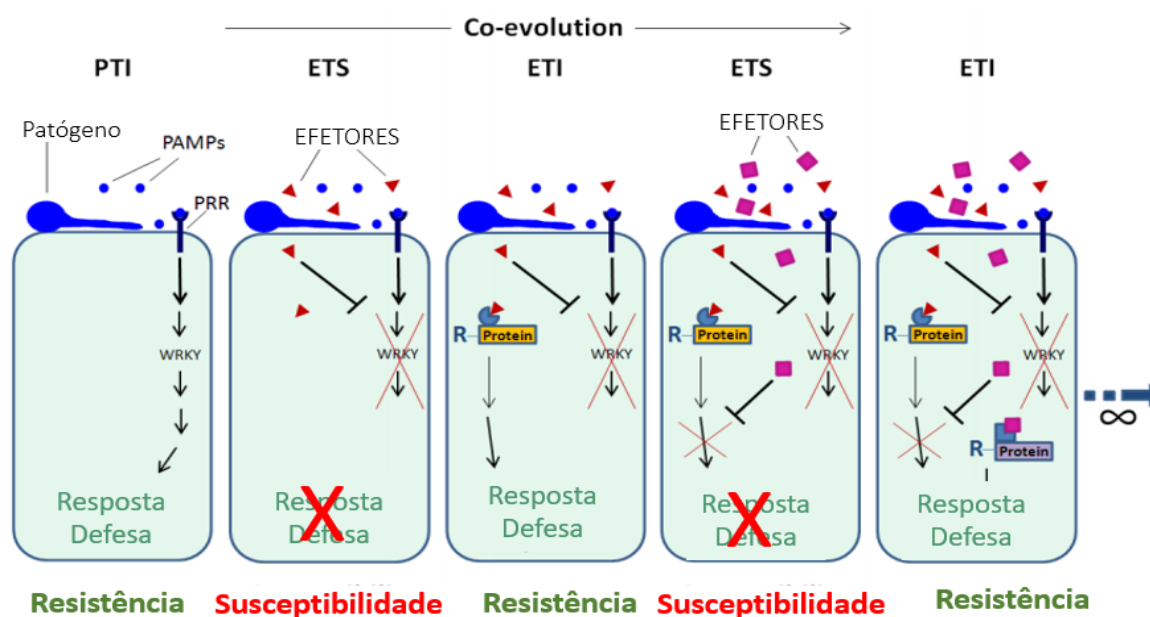


Figura 12-Representação esquemática da co-evolução entre plantas e patógenos. Fonte: Jones; Dangls (2006), com adaptações.

De acordo com o modelo (**Figura 12**), quando um microrganismo entra em contato com a planta para infectá-la, ele encontra uma primeira barreira que corresponde aos mecanismos de resistência a não-hospedeiro. Ocorre o reconhecimento de PAMPs, resultando em uma cascata de sinalização, geralmente através de fatores de transcrição WRKY que levam à imunidade desencadeada por PAMP (PTI). O patógeno pode vencer essa barreira de duas formas: evitando o reconhecimento de seu PAMP através de mutação ou secretando efetores que minam o sistema de defesa (“*effector triggered susceptibility*”-ETS), resultando em suscetibilidade desencadeada por efetor. Por sua vez, as plantas adquiriram resistência (R): proteínas que reconhecem efetores, tornando o patógeno avirulento (avr), são selecionadas e a resistência é restabelecida (“*effector triggered immunity*”-ETI). No entanto, um novo ciclo se inicia, pois a pressão de seleção atuará agora na população do patógeno de modo a selecionar aqueles genótipos que produzem

moléculas efetoras que não são reconhecidas pelo hospedeiro, resultando em nova quebra de resistência (ETS). O ciclo se perpetua desse modo, como uma “corrida armamentista” (JONES; DANGL, 2006). Este processo pode ser repetido várias vezes, tendendo ao infinito.

As alterações metabólicas envolvidas com os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves do metabolismo primário e secundário. Entre estas temos a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Essa enzima é fundamental na biossíntese de fenilpropanóis, atuando na conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, o que resulta em diversos compostos fenólicos, como as fitoalexinas, flavonóides e, principalmente, lignina, que confere resistência à parede celular. Estes compostos fenólicos atuam como sinalizadores para respostas de defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (STANGARLIN et al., 2011)

Por outro lado, as proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) respondem pelas maiores mudanças quantitativas nas proteínas solúveis durante as respostas de defesa, sendo subdivididas em diversos grupos, tais como β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), dentre outras, exercendo um importante papel no mecanismo de defesa (DE WIT, 2007; SHETTY et al., 2009).

As β -1,3-glucanases e quitinases são proteínas que exibem formas ácidas e básicas, sendo que as formas básicas ocorrem de modo geral intracelularmente (nos vacúolos) e as ácidas, extracelularmente (nos espaços intercelulares). Várias pesquisas indicam que as formas extracelulares possuem função imediata de defesa das plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (ação fungicida). Essa ação provoca a liberação de elicitores oligossacarídeos a partir de paredes fúngicas, as quais podem levar a ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência das plantas. As formas intracelulares parecem atuar tardiamente nas reações de defesa das plantas, caso as formas extracelulares não sejam capazes de impedir o crescimento do patógeno nos tecidos vegetais. Neste caso, ocorre o colapso da célula e a liberação das formas intracelulares básicas do vacúolo (GROVER, 2012; BALASUBRAMANIAN et al., 2012).

As peroxidases (H_2O_2 oxiredutases) catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de H_2O_2 , dando origem à lignina. As peroxidases participam também da biossíntese de etileno, oxidação de

compostos fenólicos e estão relacionadas com respostas de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. Os compostos antioxidantes não enzimáticos, como os compostos fenólicos, apresentam uma grande diversidade química e diversas funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa da planta, atuando diretamente sobre o patógeno, exibindo atividades antifúngica e antibacteriana, como, por exemplo, os ácidos clorogênico e caféico, e as fitoalexinas. Outros funcionam como agentes redutores, como o ácido ascórbico e os flavonóides em geral (AGRIOS, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2017).

2.4 Patossistema estudado: oídio da soja (*Erysiphe diffusa*)

As doenças da soja são o principal motivo da redução do rendimento e da variação da produtividade de uma safra para outra. A manifestação das doenças depende principalmente das condições climáticas e da suscetibilidade dos cultivares. Desta forma o aspecto fitossanitário é considerado o fator limitante para a obtenção de altos índices produtivos. Dentre inúmeras doenças que atacam a cultura temos o oídio [*Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu] que atualmente recebe lugar de destaque, pois representa perdas significativas nas lavouras de soja (DE ALMEIDA; FORCELINI; FIALLOS, 2017; YORINORI, 1997).

Oídio é uma das doenças mais antigas da soja. Inicialmente, foi atribuído ao fungo *Erysiphe polygoni* Dc. ex. Merat, e a *Microsphaera diffusa* Cook e Peck, porém, atualmente *Erysiphe diffusa* é considerado como principal causador do oídio nesta cultura (BRAUN; TAKAMATSU, 2000). Esse fungo infecta também diversas espécies de leguminosas. É um patógeno obrigatório que se desenvolve em toda a parte aérea da soja, incluindo haste, pecíolo e vagem (raramente observada), sendo mais visível em folhas e hastes (YORINORI, 1986). Os sintomas são característicos pela presença de eflorescência branca, pulverulenta, que pode recobrir folhas. Este fungo é favorecido por ambientes secos e quentes (IGARASHI et al., 2010).

Apesar de ser pouco comum a morte da planta, os efeitos prejudiciais são evidentes através da redução no desenvolvimento e produção do hospedeiro. Esses danos são decorrentes de interferência do fungo no processo de fotossíntese, retirada de nutrientes da célula e diminuição da quantidade de luz que chega à superfície da folha. Em alguns casos, os danos a produção chegam a 40%. O

controle dos oídios baseia-se fundamentalmente na utilização de variedades resistentes e no uso de produtos químicos (PÉREZ-VEGA, 2013).

2.4.1 Sintomatologia

Os sintomas são facilmente identificáveis, e sempre se manifestam na forma de eflorescência ou bolor pulverulentos de coloração branca ou levemente cinza. Essa eflorescência, formada por micélio, conidióforos e conídios do patógeno, pode ser encontrada em diversos órgãos vegetais, como meristemas, ramos jovens, flores, frutos em formação e principalmente folhas. A doença é observada mais frequentemente na face superior das folhas; em alguns casos, no entanto pode ser constatada também na face inferior (SARTORATO; YORINORI, 2001).

A infecção da soja por oídio é favorecida por temperaturas em torno de 30 °C, média a alta umidade relativa do ar (50-90%) e baixa incidência e intensidade de precipitação. Todavia, o desenvolvimento micelial é mais rápido à temperatura de 18°C do que à de 24°C ou 30°C. Observações a campo têm demonstrado que o desenvolvimento da doença é mais rápido quando a temperatura do ar é inferior a 30°C (GRAU; LAURENCE, 1975).

A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, porém, é mais visível por ocasião do início da floração. Quanto mais cedo iniciar a infecção, maior será o efeito da doença sobre o rendimento. Cada ciclo desta doença, sob condições favoráveis à mesma, dura cerca de sete a dez dias. Assim, nos casos de elevada colonização do fungo nos tecidos superficiais da planta, é possível ocorrer uma redução significativa no rendimento da soja devido à redução da área fotossintética ativa em até 50% e, em casos severos, o consequente secamento e queda prematura das folhas (PÉREZ-VEGA, 2013).

Outros fatores, como época de semeadura e fase de desenvolvimento da planta, influenciam significativamente na severidade da doença. Assim, algumas cultivares consideradas resistentes se tornam suscetíveis quando plantadas nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença (GRIGOLLI, 2014).

2.4.2 Ciclo Relação Patógeno-Hospedeiro

O esporo (conídio ou ascósporo) do fungo, ao cair na superfície da folha germina e produz uma teia de micélio que se espalha pela superfície da planta. O micélio penetra nas células epidermais e, através de haustórios, nutre-se do conteúdo das células. Na superfície da planta, forma-se uma fina camada de micélio e esporos (conídios) pulverulentos que, de pequenos pontos brancos, podem cobrir toda a parte aérea da planta, sendo menos frequente nas vagens. Nas folhas, com o passar dos dias, a coloração branca do fungo muda para cor castanho-acinzentada, dando a aparência de uma cobertura de sujeira nas duas faces da folha (IGARASHI et al., 2010; BEDENDO et al., 2011; YORINORI, 1986).

O processo de pré-infecção, bem como germinação e reprodução de *E. diffusa* se inicia após três horas da inoculação. Com oito horas, o apêndice de infecção é formado, penetrando às células epidérmicas. Desse modo, o fungo penetra na cutícula, formando os haustórios nas células da epiderme, não infectando as células do mesófilo, ocorrendo a formação dos conídios após 144 horas da inoculação (MIGNUCCI; CHAMBERLAIN, 1978; SARTORATO; YORINORI, 2001).

Apressórios se desenvolvem e amadurecem de 6 a 10 horas após a inoculação, e as respostas do hospedeiro ocorrerem durante este tempo. Enquanto isso, algumas respostas bioquímicas do hospedeiro estão ocorrendo e podem influenciar o resultado do encontro iminente entre o apressório e a célula hospedeira. Durante a quarta e quinta horas após a inoculação, as actividades de três enzimas chaves envolvidas na metabolismo secundário da planta podem ser expressadas, são elas: fenilalanina amôniaiyase (FAL), tirosina (TAL), peroxidase e fitoalexinas (GREEN et al., 1975). A defesa eficaz de plantas contra oídio é geralmente organizada em diferentes etapas subseqüentes. Defesa antecipada impede a penetração. A segunda linha de defesa inibe a absorção de nutrientes pelo haustório (KUNOH, 1982).

A disseminação do patógeno é realizada principalmente pelo vento, que distribui os conídios a distâncias relativamente longas. A água pode atuar como agente controle, retirando as estruturas do fungo encontradas na superfície do hospedeiro, prejudicando seu desenvolvimento e sua dispersão (BEDENDO et al., 2011).

2.4.3 Controle

O oídio é dificilmente controlado por técnicas convencionais, visto que o fungo produz esporos que são facilmente dispersos pelo vento. Além do mais, o fungo pode ser transmitido por resíduos vegetais e algumas ervas daninhas (PÉREZ-VEGA, 2013). O principal método de controle dessa doença é através de cultivares resistentes. Entretanto, não havendo disponibilidade de cultivares com essas características, ou no caso de quebra da resistência de uma cultivar, são utilizados tratamentos químicos com fungicidas. Os ingredientes ativos registrados para controle dessas doenças encontram-se em três grupos principais de fungicidas sistêmicos, formados pelos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Também são possíveis misturas prontas de ingredientes ativos entre os fungicidas tradicionalmente usados contra o oídio (YORINORI, 2001).

O controle alternativo dessa doença vem sendo muito pesquisado. Os testes de controle biológico mais promissores envolveram vários fungos antagônicos aos oídios e resultaram no desenvolvimento de dois produtos biofungicidas: o AQ10 Biofungicide® que contém esporos de fungos de *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlechtend e apresenta ação através do hiperparasitismo, atuando em todos os estágios de desenvolvimento da doença e com alta seletividade. Também Sporodex®, que compreende a levedura basidiomicótica *Pseudozyma flocculosa* (Traquair, L. A Shaw & Jarvis) Boekhout & Traquair (BENUZZI; BALDONI, 2000). Esses dois produtos já foram registrados e comercializados em alguns países. Outro estudo no controle do oídio é uso de extratos do óleo de nim (CARNEIRO et al., 2007).

Outros fungos também foram extensivamente estudados para o mesmo propósito de biocontrole. Arruda et al. (2012) avaliaram o efeito dos extratos aquosos de *Agaricus subrufescens*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* no controle do oídio em casa de vegetação e na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja. Demonstram que os extratos tiveram um efeito sobre *Erysiphe diffusa* e também apontam para a ocorrência da indução de resistência ativando fitoalexinas (gliceolina) *in vitro*.

2.5 Toxicologia a organismos não-alvo

2.5.1 Embriotoxicologia- desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus domesticus* L.

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos. Tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos. Ou seja, a toxicidade reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também do tempo de exposição (JAMES et al., 2000).

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (SÁNCHEZ-BAIN, et al., 2004).

As aves constituem um modelo altamente utilizado em laboratório para estudos de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento, pois apresentam diversas vantagens em relação a outras espécies. São de fácil obtenção, manipulação, possuem desenvolvimento curto e semelhante ao de outros grupos animais, como os mamíferos, porém independente da mãe e de nutrientes externos. São muito utilizados para investigações dos efeitos de compostos químicos sobre o desenvolvimento inicial do embrião, pois nos estádios precoces de desenvolvimento apresentam-se muito suscetíveis à ação de agentes tóxicos, podendo assim alterar o desenvolvimento embrionário normal e interferir nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos (RIVERO et al., 2006).

A espécie de ave mais utilizada em laboratório é a *Gallus gallus* (galinha), cujo desenvolvimento inicial pode ser comparado ao dos humanos até o segundo mês de gestação. A clivagem nas aves tem início 3 horas após a fecundação, o que corresponderia a 24 horas após a fertilização em humanos. O terceiro dia, quando são formados os somitos, cérebro, olhos, ouvidos e componentes do sistema vascular equivale a terceira - quarta semana de gestação em humanos. Já o quarto

dia de incubação, corresponderia ao segundo mês de desenvolvimento humano intrauterino (MOORE; PERSAUD, 2008).

Outros aspectos que favorecem seu uso são: os ovos são do tipo megalécito (dispondo de reservas nutricionais e não dependendo do ambiente externo para nutrição durante o desenvolvimento embrionário); apresentam membranas envoltórias resistentes; o tempo total de desenvolvimento é curto (21 dias no caso de galinhas); os embriões desenvolvem-se na ausência do organismo materno e na região superior do ovo, permitindo que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado diariamente em laboratório (SCHOENWOLF, 1999).

O desenvolvimento embrionário da galinha é muito bem documentado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) e os embriões são classificados em estádios, que relacionam o surgimento de estruturas no embrião e o tempo de desenvolvimento. A divisão em estádios é importante, pois vários fatores - diferenças genéticas, sazonais, tamanho dos ovos, tempo entre a postura e a incubação dos ovos - podem causar variações nos embriões, o que torna ineficiente a classificação baseada somente na idade cronológica. Do estágio 7 ao 14 a classificação é baseada principalmente no número de pares de somitos, enquanto que do estágio 15 em diante, os critérios utilizados para identificação dos estádios embrionários são baseados em estruturas externas, como os brotos dos membros e arcos viscerais (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

Aproximadamente três dias após a postura do ovo, o embrião possui 40 somitos, cabeça bem desenvolvida, coração formado e vasos conectados com os tecidos extraembrionários, possibilitando assim a circulação com batimentos cardíacos. Nesse estágio, o embrião recebe a nutrição através das membranas extraembrionárias, proteção mecânica proveniente do saco amniótico cheio de fluido e um alantóide para o armazenamento dos produtos oriundos da excreção. No tempo restante, antes da eclosão, se desenvolvem os olhos e os ouvidos, o embrião cresce em tamanho e os órgãos internos se desenvolvem. As asas, pernas e bico se formam e as penas surgem nas asas e no corpo. Após 21 dias de incubação o pinto eclode (WOLPERT et al., 2000).

2.5.2 Ecotoxicologia pelo uso de *Artemia salina* como indicador

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que concentra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas aquáticos. A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, vários ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido inicialmente para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (SILVA et al., 2005).

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante a bioprospecção de substâncias. O ensaio de letalidade com o uso da *Artemia salina* é rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos mais complexos (RUIZ et al., 2005).

O microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Artemiidae) Pertence ao Filo Arthropoda, Classe Crustacea, um invertebrado de ecossistemas aquáticos salinos e marinhos, muito usado em ensaio laboratorial de toxicidade e outras ações de estimativa da dose letal (AYO et al., 2007). O estágio de larvas de *A. salina* são os usados em testes laboratoriais. A identificação da dose efetiva para 50% de mortalidade das larvas (DE50) acontece depois de seis horas de exposição, fazendo deste um teste rápido e simples (KANWAR, 2007).

Os ovos de *A. salina* são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e permanecem viáveis por anos se armazenados em condições ideais. Quando colocados em água marinha, os ovos eclodem dentro de 48h e geram um grande número de larvas (fase náuplio) para o uso experimental, o que confere vantagens a esse tipo de ensaio biológico, além de poder ser utilizado como bioindicador e biomonitor da qualidade da água, como por exemplo, na determinação da citotoxicidade de pesticidas (VARÓ et al., 2002).

Esta metodologia tem sido empregada ainda para detectar toxicidade preliminar, realizar triagem de toxinas fúngicas, avaliar efeitos de exposição a metais pesados e pesticidas e para testes de toxicidade em materiais dentários (PELKA et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitossanidade, Indução de Resistência e na casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos – PR, no período de 2017 à 2018. O processo de cultivo micelial e eliciação de *G. lucidum* em meio líquido foi realizado de acordo com o diagrama apresentado na Figura 3.1. Já na Figura 3.2 consta uma esquematização metodológica da elaboração dos experimentos que foram realizados com os filtrados dos cultivos miceliais (FCM).

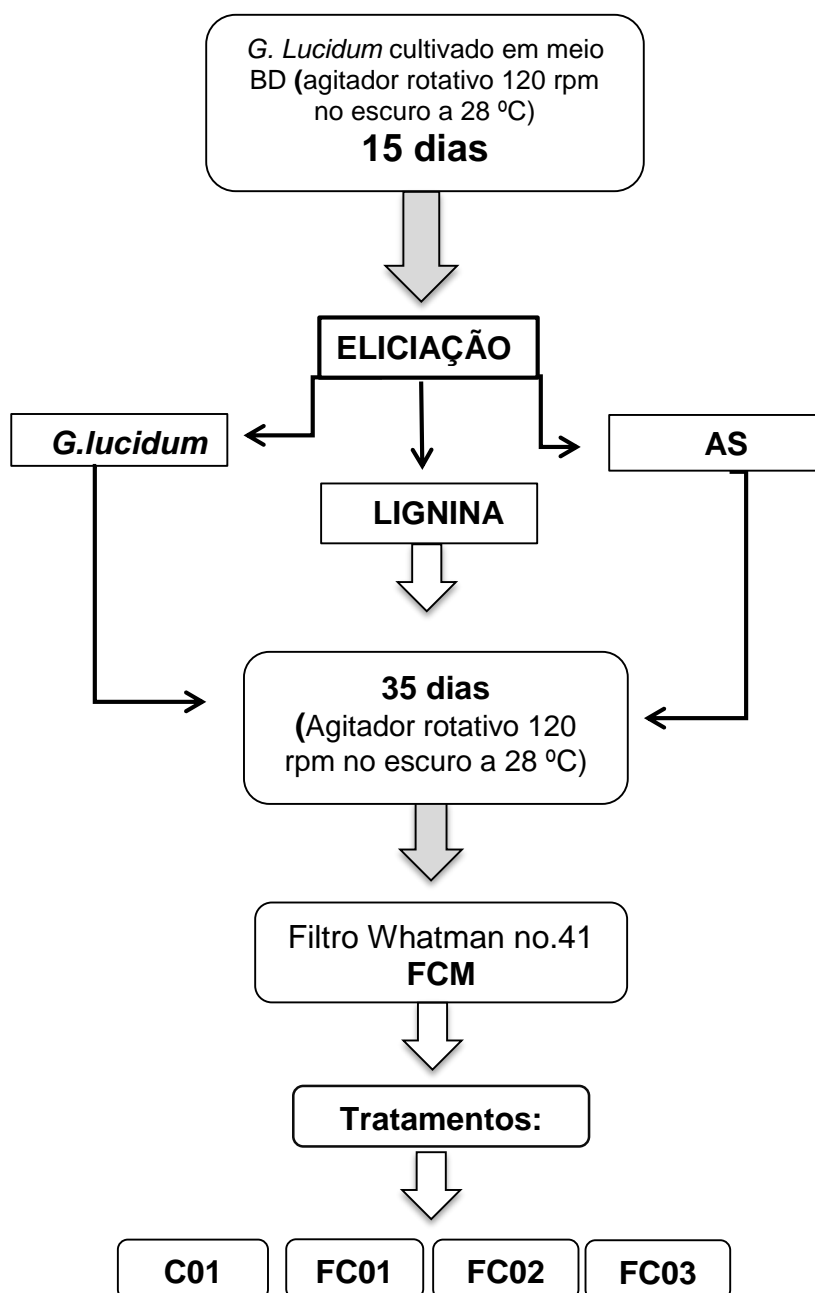


Figura 13- Diagrama demonstrando o processo de fermentação em meio líquido de *Ganoderma lucidum*, que inicialmente teve um período de incubação de 15 dias. Posteriormente, foi realizada a eliciação, permanecendo o fungo por mais 35 dias em fermentação submersa. Após período total de 50 dias, foram obtidos os filtrado do crescimento micelial (FCM), que consistiram em: C01 - controle, F01 - filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina, FC03 - filtrado da eliciação com AS. Estes filtrados foram utilizados nos diferentes tratamentos aplicados nos experimentos descritos nas seções subsequentes. Fonte: o autor, (2019).

Os filtrados do cultivo micelial e eliciação de *G. lucidum* em meio líquido foram testados de acordo com o diagrama :

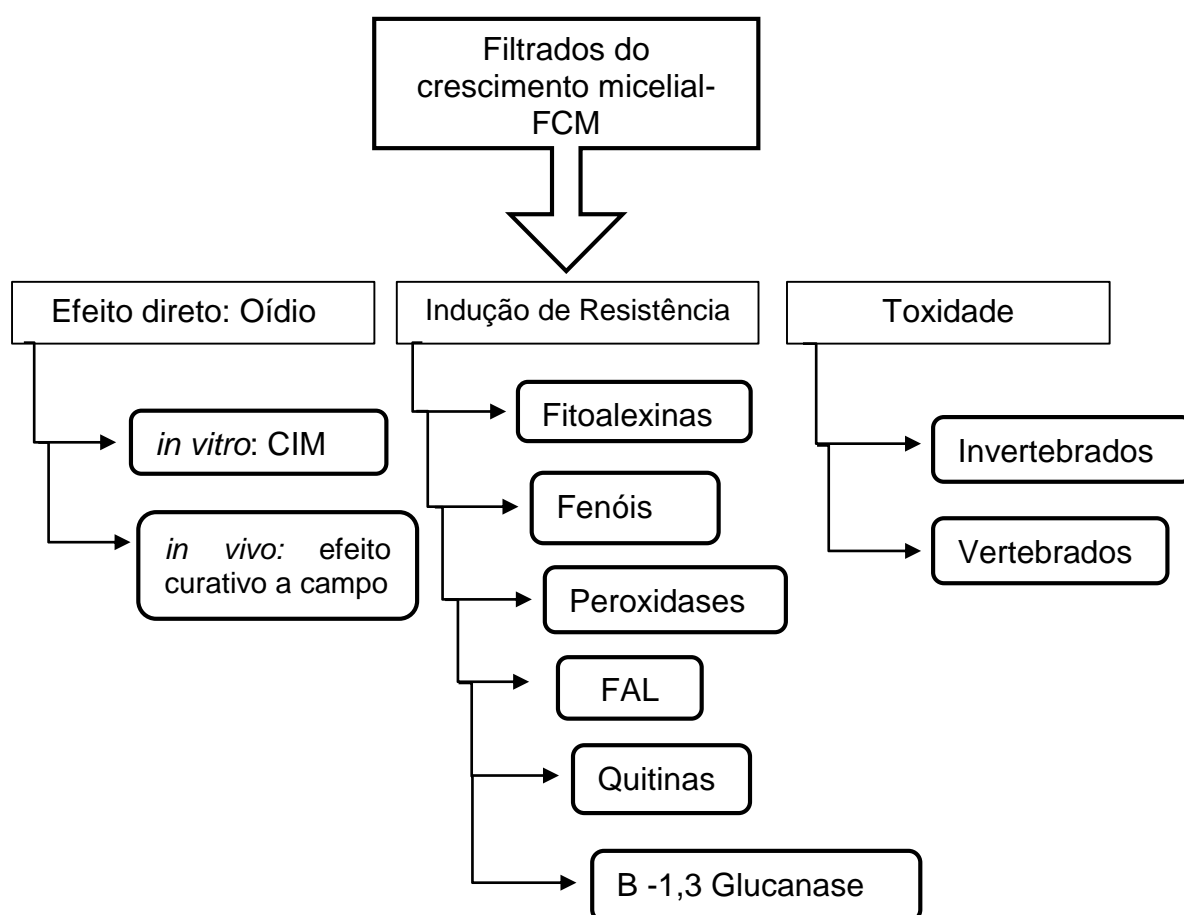


Figura 14-Diagrama demonstrando os bioensaios que foram realizados com os FCM de *Ganoderma lucidum*. Fonte: o autor, (2019).

3.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos e material vegetal

Ganoderma lucidum CC339ST foi obtido através de Termo de Transferência de Material Genético da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA CENARGEN). A cepa foi cultivada em placas de Petri® com meio Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas a 28 °C durante 10 dias. O micélio foi ativado em BDA com o mesmo procedimento, para utilização para cultivo em meio líquido.

O fungo *Erysiphe diffusa* utilizado para testes *in vitro* e *in vivo* foram obtidos de plantas apresentando sintomas e sinais de doença. Plantas de soja (cultivar NA5909) foram cultivadas em casa de vegetação sob condições ambientais controladas para testes *in vivo*.

3.2 Cultivo em meio líquido e eliciação

Para o processo de fermentação inicialmente foram transferidos discos de 0,5 cm de diâmetro de *G. lucidum* crescido em cultura BDA para erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de meio líquido batata-dextrose (BD) previamente esterilizado a 120 °C por 20 min, e foram incubados em agitador orbital ("shaker") a 120 rotações por minuto (rpm), no escuro a 28 ± 2 °C, por 15 dias.

Após esse período, foram adicionados ao meio fermentado os eliciadores. Sendo estes, o ácido salicílico (AS) na concentração 2 mM, padrão de lignina a 5%. O ácido salicílico e a lignina foram dissolvidos em água e esterilizados, para serem adicionados ao meio de cultivo. Os erlenmeyers contendo os tratamentos com os elicitores foram mantidos em shaker a 120 rotações por minuto (rpm), no escuro a 28 ± 2 °C, por mais 35 dias, totalizando 50 dias de fermentação em meio líquido. Após esse período, os meios foram filtrados através de papel de filtro Whatman no.41, obtendo o filtrado do crescimento micelial (FCM), onde teremos: FC01 - filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina; FC03 - filtrado da eliciação com AS. Os controles foram: C01- água destilada, C02- oxiclreto de cobre (0,5-1,5 L/ha); C03- Azoxistrobina + Ciproconazol (0,3-1,5 L/ha).

Uma parte da suspensão foi filtrada em filtro Whatman no.41 e centrifugada a 20.000 g por 10 min, sendo o sobrenadante filtrado em membrana tipo Millipore® (diâmetro do poro = 0,2 µm) sob condições assépticas e utilizado para testes *in vitro* sobre oídio (tópico 3.4.1). Os FCM foram armazenados em geladeira a $04 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e utilizados nos experimentos.

3.3 Efeito antifúngico dos filtrados do crescimento micelial

3.3.1 Efeito *in vitro*: determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos bioativos de *G. lucidum* foi avaliada pelo método de difusão em poços utilizando placas de Elisa® sobre *Erysiphe diffusa*. Foi realizado seguindo a norma M38-A proposta pelo CLS(2008), com algumas modificações.

Nas microplacas estéreis de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio BD em cada poço. Posteriormente, foram pipetados 100 µL dos tratamentos: C01: meio BD, C02- oxicloreto de cobre ($1,0 \text{ L ha}^{-1}$) C03- Azoxistrobina + Ciproconazol ($1,0 \text{ L ha}^{-1}$), F01- filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS.

Os tratamentos foram pipetados apenas no primeiro poço da coluna e a partir dele foi realizada a diluição seriada do primeiro até o último poço obtendo a concentração final de cada poço de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 e 0,0781 mg/mL. Por fim, foi pipetados 10 µL das suspensões microbiana em cada poço, de acordo com a **Figura 15**.

Uma suspensão de esporos de *Erysiphe diffusa* foi previamente preparada em solução salina e, de tal forma que a concentração final foi de 1×10^4 esporos mL⁻¹, concentração aferida na câmara de Neubauer. As microplacas foram mantidas dentro de uma câmara de crescimento a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para a revelação dos resultados três horas antes do final da incubação, 10 µL de solução de tetrazólio (0,01%) foram adicionados em cada poço. Foi considerada como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do fungo. Os valores de CIM foram considerados concordantes quando não houve uma variação maior do que duas diluições entre as concentrações.

O mecanismo de reação do tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias

durante a glicólise e o ciclo do ácido cítrico. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando há atividade de microrganismos (células vivas) nos poços da placa, ocorre a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não-difusível, conhecido por trifenilformazan (BULAT, 1961; COPELAND et al., 1959).

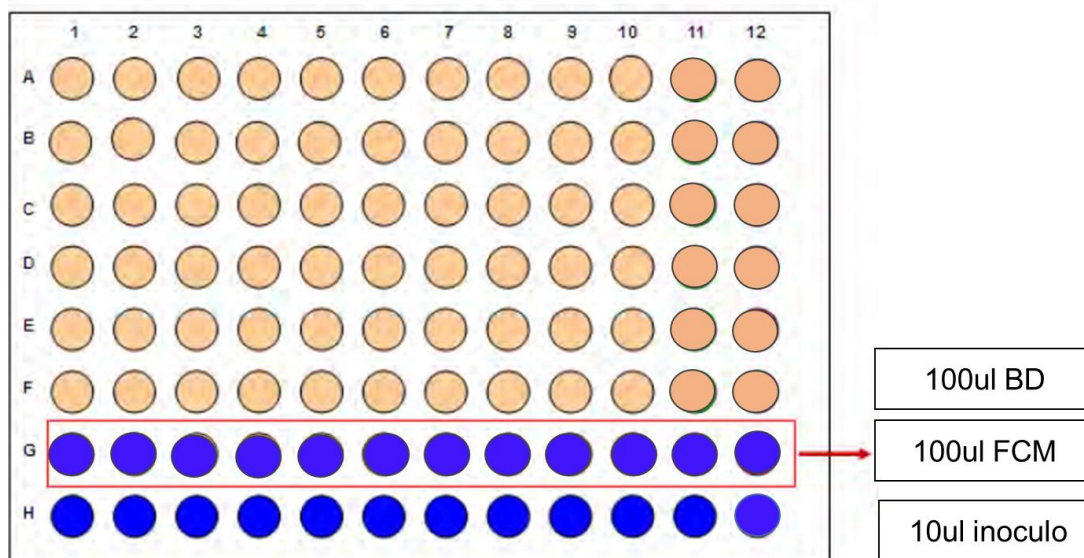


Figura 15-Teste de efeito antifúngico in vitro pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços. Fonte: o autor (2019).

3.3.2 Efeito *in vivo*: aplicação foliar em plantas de soja

O experimento foi realizado em condições de campo em uma área de 30m², contendo cinco linhas de 10 metros espaçadas por 0,45 m. Foram plantadas 15 sementes por metro/ linear. Área de implantação foi na área experimental de Fitopatologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos – PR, situada a 25°, 42' S e 53°, 03' W, a 519 metros de altitude. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico Típico e o terreno apresenta em torno de 3% de declividade média. O experimento foi realizado 05/02/2017 a 05/03/2017. **(Figura 16)**.



Figura 16-Área utilizada para realização do experimento, plantas com alta incidência de doença. Fonte: o autor, (2019).

O experimento iniciou quando as plantas atingiram estágio fenológico V5 e alta incidência de oídio. Os tratamentos consistiram em F01 - filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina, FC03 - filtrado da eliciação com AS. Os controles foram: C01- água destilada, C02- oxiclóreto de cobre (1 L ha^{-1}); C03- Azoxistrobina + Ciproconazol (1 L ha^{-1}).

A aplicação foi realizada por pulverização, utilizando spray manual, em uma faixa no centro da folha central dos folíolos do trifólio com auxílio de um marcador sem possibilidade de deriva. A aplicação teve início às 8h:30min com umidade relativa de 72%, temperatura média de 25.3°C e velocidade do vento de 10.4 km/h .

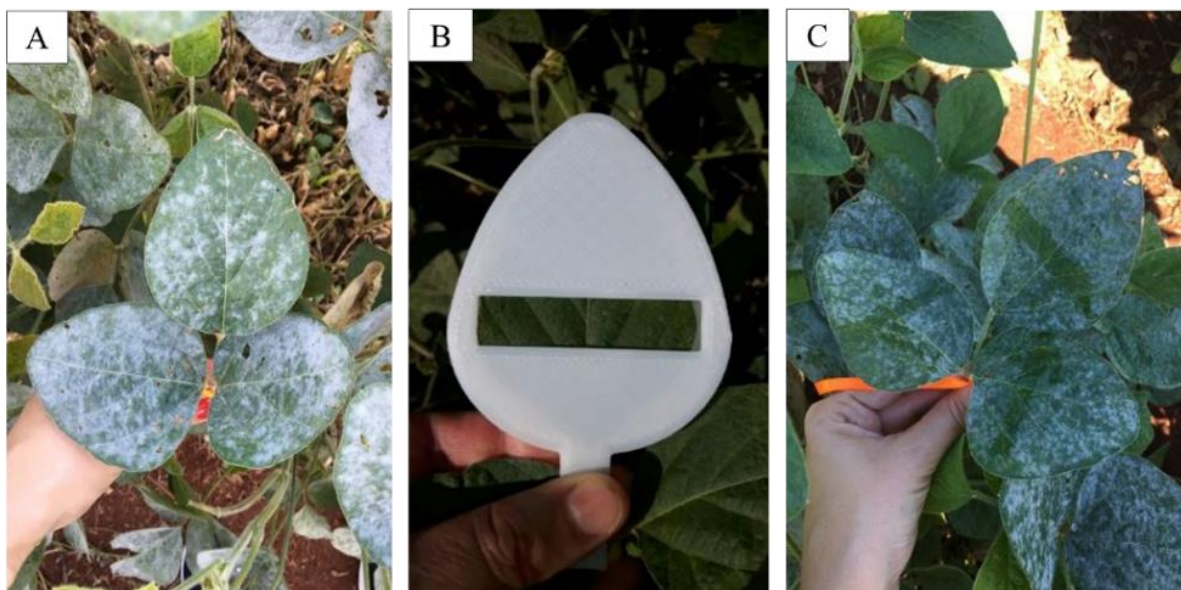


Figura 17- (A) Plantas de soja antes da aplicação dos tratamentos, (B) marcador para aplicação dos tratamentos, (C) plantas no momento da aplicação dos tratamentos. Fonte: o autor (2019).

O delineamento experimental foi realizado em três blocos, com seis tratamentos (FCM e controles). As repetições foram consideradas 18 trifólios que foram marcados de forma aleatórias nos blocos. As avaliações de severidade da doença ocorreram a 2, 5, 7 e 10 dias após aplicação. Foi avaliada a presença de sinais do patógeno na faixa do folíolo pulverizado, através de notas visuais, utilizando-se a escala de notas proposta para este trabalho. sendo: 0 - sem controle; 1- baixo controle protetor; 2- eficiente controle protetor; S - ação sistêmica.

Os resultados, por não apresentarem uma distribuição paramétrica, foram analisados pelo teste de Friedman, onde os dados foram ordenados em ranks. Foi utilizado Software RStudio® (The R Foundation for Statistical Computing), e o pacote agricolae (Statistical Procedures for Agricultural Research), para realização das análises.

3.4 Efeito da na Indução de Resistência em plantas

3.4.1 Ativação de fitoalexinas em cotilédones de soja

Sementes de soja foram semeadas em bandejas de polipropileno contendo areia autoclavada, sendo mantidas em câmara BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após 10 dias, os cotilédones das plântulas foram removidos e lavados em água destilada.

Na face abaxial dos cotilédones foi feito um corte superficial e sobre o corte depositados 40 uL das soluções dos tratamentos que foram descritos no tópico 3.3.1. Os FCM foram usados nas concentrações de 2%, 5%, 10% e 20%. Os cotilédones foram pesados e então colocados em placas de Petri® (quatro por placa) forradas com disco de papel de filtro umedecidos com água destilada. As placas tampadas e não-vedadas foram mantidas em BOD a 26°C, no escuro. Após 20 horas os cotilédones foram retirados das placas e colocados em tubos plásticos contendo 10 mL de água destilada os quais foram agitados em mesa agitadora a 80 rpm, por uma hora para a extração de gliceolina. Após a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 41 e a absorvância foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 285 nm, de acordo com metodologia descrita por Labanca (2002).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, compreendendo quinze tratamentos com cinco repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram analisadas e comparadas pelo teste Scott Knott ($p < 0,5$) através Software RStudio®, pacotes (ExpDes.pt; readxl ; ggplot2).

3.4.2 Proteção de plantas de soja em casa de vegetação

Subsequentemente, os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com temperaturas médias de 25 ± 3 °C e fotoperíodo médio de 12h no decorrer dos experimentos. Sementes de soja foram semeadas em vasos de polietileno com capacidade para 10 litros contendo solo proveniente de lavoura de soja. Os vasos serão mantidos em casa de vegetação, com temperatura média de 25 ± 2 °C.

Os tratamentos consistiram em: C01- água destilada, C02- oxicloreto de cobre (1 L ha^{-1}), F01- filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Realizou-se a aspersão na parte aérea da planta, na concentração de 20 % (v/v), sendo aplicados 10 mL por planta. Água destilada foi utilizada como controle. Foram realizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo cinco plantas. Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com o patógeno. Plantas contendo sintomas de oídio foram colocadas aleatoriamente na casa de vegetação.

Posteriormente à aplicação, os vasos foram ordenados de maneira aleatória na casa de vegetação, intercalando os tratamentos. Folhas das plantas foram coletadas da terceira e quarta folha (da base para o ápice) nos tempos 0, 48, 96 e 192 horas após os tratamentos. De cada planta foram coletadas duas folhas, totalizando 4 folhas amostradas por repetição (vaso). Nas coletas, os folíolos foram dispostos em envelopes de papel-alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer, até serem processadas para as diferentes análises bioquímicas.

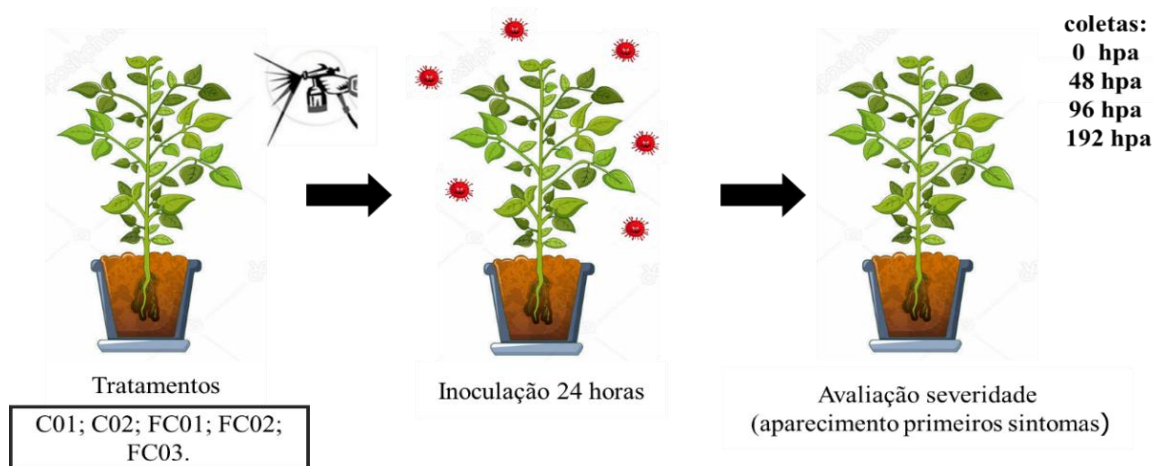


Figura 18-Esquema das condições nos ensaios de proteção de plantas de soja em casa de vegetação (hpa: horas após aplicação). Fonte: o autor (2018).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com cinco tratamentos com cinco repetições e quatro tempos de coletas de material vegetal, 0, 48, 96 e 192 hpa. Os dados obtidos foram submetidos à teste Shapiro-Wilk para testar a homogeneidade da variância e distribuição normal. Foram submetidos ao teste de Tukey nível de 5% de probabilidade de erro. Todos os testes estatísticos foram calculados utilizando o Software RStudio® e os pacote ExpDes.pt

3.4.3 Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa

3.4.3.1 Obtenção dos extratos proteicos

Os extratos proteicos foram obtidos pela maceração das amostras das folhas (0,5 g a 1 g) em 4 ml de tampão de extração, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), com 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVPP) e 0,2 g de EDTA, com o objetivo de proporcionar a absorção e inibição da oxidação de enzimas e compostos fenólicos presentes nas folhas. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 30 minutos a 4° C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático.

3.4.3.2 Proteínas totais

Os teores de proteína foram determinados usando o teste proposto por Bradford (1976), com tampão fosfato 0,2 molar (0,2 M), pH 7,5 e reagente Bio-Rad®. Para tal, adicionaram-se 40 µl do sobrenadante do extrato vegetal para tubos de ensaio, 460 µl de água destilada e 1 ml de reagente concentrado de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex, e após 10 min. realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em µg equivalentes de albumina de soro bovino (ASB), utilizando-se de curva-padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg/mL. A atividade das enzimas relacionadas à patogênese foram expressas em relação ao conteúdo total de proteínas das amostras

3.4.3.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina segundo Kuhn (2007), com algumas modificações. A mistura da reação, 100 µL do extrato proteico, 400 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina (49,6 mg/mL), foi incubada a 40°C por 1h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl e banho de gelo (5 min). A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, as leituras de absorbância foram interpretadas em relação a uma curva padrão

elaborada com o ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática foi expressa em mg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4.3.4 Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo o método adaptado de Bieleski e Turner (1966). A primeira compreendeu a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA), na relação 6: 2,5: 1,5 v/v, no material vegetal, com trituração em almofariz à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação a 6000 g por 20 min, sendo coletado o sobrenadante. Posteriormente, foi realizada nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, centrifugando novamente a 6000 g por 20 min e o sobrenadante sendo adicionado ao primeiro, obtendo-se assim o extrato MCA. A esse extrato foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, procedendo-se nova centrifugação a 6000 g por 15 min para separação das fases. A segunda etapa consistiu na determinação de fenóis totais, realizada pelo método adaptado de Jennings (1991). A quantificação de fenóis foi feita através de uma curva padrão utilizando tirosina. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extração dos fenóis (extrato MCA), a seguir foram adicionados 0,5 mL de água destilada, mais 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 min., foram adicionados 5 mL do reagente alcalino "A" (preparado com carbonato de sódio a 2 % em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N), permanecendo durante 50 minutos até a leitura da absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro. No controle negativo, foi usada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em mg.g^{-1} de tecido fresco.

3.4.3.5 Atividade de peroxidases

A atividade das peroxidases foi quantificada de acordo com a técnica de Matsuno e Uritani (1972), com modificações e padronização realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fitossanidade da UTFPR – Dois Vizinhos. As amostras foram maceradas em 5 mL de solução extratora – tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Foram adicionados 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma); o extrato

foi centrifugado por 20 min. a 4.000 g em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático. Posteriormente, em tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0), 0,5 mL de água oxigenada a 3 %, 0,5 mL de guaiacol 0,5 % e 3,0 mL do extrato enzimático. Esta mistura foi levada para incubação em banho maria por 15 minutos a 30° C. Após incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo onde permaneceram por mais 5 minutos. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de bissulfito de sódio para paralisar a reação. As leituras foram realizadas, após 10 minutos de repouso, em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm.

3.4.3.6 Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases

Para dosagem das atividades de quitinases e β -1,3-glucanases, as amostras foram maceradas em 4,0 mL de tampão de extração de acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante (extrato protéico) foi coletado e 200 μ L utilizados para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática das quitinases foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para tanto, 200 μ L do extrato foram misturados a 600 μ L do mesmo tampão de extração e a 200 μ L de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 min a 40°C a reação foi paralisada com a adição de 200 μ L de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 g por 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada como referência e os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.(mg de proteína)⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 μ L de tampão de extração + 200 μ L de “CM-chitinRBV”).

Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanases nos extratos foi utilizada, como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.ml⁻¹, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth e Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo e Martins (1996). Para tanto, 200 μ L do extrato protéico foram misturados com 600 μ L do mesmo tampão de extração e 200 μ L de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a

adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 g / 5 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 600 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.(mg proteína)⁻¹.

3.4.4 Avaliação da doença

A avaliação de severidade teve início quando os primeiros sintomas apareceram nas plantas. A avaliação foi realizada segundo a escala diagramática de Matiazzi (2003) (figura 3.6). Foram realizadas cinco avaliações, respeitando intervalos de 10 dias entre elas. Para cada dado obtido calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) usando a equação (SHANER e FINNEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=0}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) \times 0,5] [t_{i+1} - t_i]$$

Onde:

n = número de avaliações;

y_i = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t_i = tempo no momento da i-ésima avaliação.

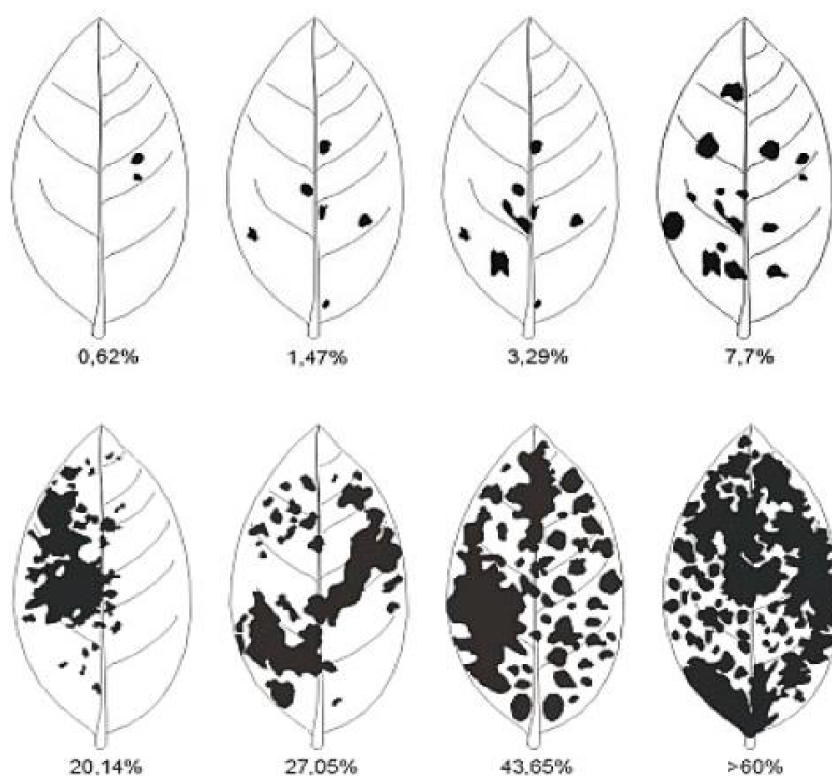


Figura 19-Escala diagramática para severidade do oídio da soja. Fonte: Mattiazzi, 2003.

Os dados foram submetidos ao teste de Normalidade de Lilliefors para verificar o atendimento aos pressupostos do modelo matemático. Os dados não foram normais e foram transformados por raiz de x , para obter-se distribuição normal. Foram submetidos ao teste de Tukey nível de 1% de probabilidade de erro. Os testes estatísticos foram calculados utilizando o programa GENES®.

3.5 Toxicidade a organismos não-alvo

3.5.1 Avaliação de ecotoxicologia, com o uso de *Artemia salina*

O presente ensaio foi realizado para verificar se os FCM apresentam características poluidoras do meio ambiente. Para a análise foi utilizada a metodologia de Meyer et al. (1982) adaptada.

Os cistos de *A. salina* foram colocados em 1L de água destilada contendo 35 g de sal marinho (0,5 mg mL⁻¹) e mantidos sob aeração e agitação constantes, a 26 ± 2°C por 48 horas para a eclosão. Após a eclosão dos cistos, 15 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo água salgada mais as concentrações (50%; 25% 15% 10% 5% e 1%) dos tratamentos que consistiram em: C01- meio BD, C02- apenas água da eclosão, F01 - filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Os microcrustáceos foram incubados por 24 horas. Decorrido este período de contato com os tratamentos, foi realizada a contagem de sobreviventes.

Os dados foram analisados pelo método Probits (FINNEY, 1962) e expressos como CL50 (concentração letal média) e percentual de mortalidade. Foram consideradas tóxicas as substâncias quando a CL50 foi menor que 1000 ppm. Resultados com 100% de mortalidade significam elevada toxicidade e de 0%, sem toxicidade.

3.5.2 Análise do desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus domesticus* L.

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) – UTFPR.

Foram utilizados para o estudo ovos fertilizados de *Gallus gallus* (matrizes pesadas da linhagem COBB ou ROSS, com idade entre 36 e 40 semanas) fornecidos por incubatório comercial da região. Os ovos foram selecionados de acordo com dois critérios: peso e presença de rachaduras - foram utilizados apenas aqueles que tiveram peso entre 60 e 65 g e não apresentaram rachaduras. Os ovos foram higienizados com papel toalha umedecido em álcool etílico 70% e identificados.

Os tratamentos consistiram em: CV- apenas meio BD, CF- grupo controle fechado onde o ovo não sofreu nenhum tipo de injeção, F01 - filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Os FCM foram utilizados na concentração de 20% v/v e foram injetados no tempo E0, quando o embrião encontrava-se no estágio de blástula para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente (Figura 1).

Após as injeções, os ovos foram mantidos por 3 dias em incubadora BOD, sob temperatura controlada a 38°C e umidade e ventilação constantes. Foram incubados e abertos, aproximadamente 200 ovos, contabilizando 40 ovos por tratamento. A quantidade de embriões classificados entre vivos e mortos é inferior ao total de ovos incubados, uma vez que ovos sem embrião visível foram considerados inférteis e descartados.

Após os períodos de incubação, os embriões foram removidos da incubadora e analisados para quantificar as taxas de vivacidade e anormalidade. Após a abertura do ovo, antes da eutanásia, foi avaliada a frequência cardíaca dos embriões por minuto, os ovos que apresentaram ausência de batimentos cardíacos foram classificados como mortos e foram descartados. Os embriões que sobreviveram foram coletados para o estudo anátomo-morfológico. Toda alteração morfológica foi considerada como critério para análise da anormalidade, em comparação às descrições realizadas por Hamburguer e Hamilton (1951).

Subsequentemente à análise de viabilidade os embriões foram montados pela técnica de montagem total de acordo com metodologia proposta por Yamamoto (2009). Inicialmente foi realizada uma abertura na casca dos ovos com auxílio de uma tesoura de ponta fina (**Figura 20 A**), e os discos embrionários recortados com o auxílio de tesoura e pinça (**Figura 20 B**), retirados e fixados em um pedaço de papel filtro retangular com uma janela em retângulo na região central onde foi encaixado sobre o embrião para mantê-lo distendido (**Figura 20 C**). Os embriões fixados no papel filtro foram colocados em solução fixadora Carnoy (60% álcool absoluto, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 24 horas. Na sequência os embriões foram lavados e mantidos em solução de etanol 70%. Para a coloração os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e imersos no corante Carmalúmen de Mayer (água destilada, Carmin – BHD Chemicals, Sulfato de alumínio e amônia – J. T. Baker Chemicals, ácido acético glacial) por 48h aproximadamente ou até ficarem levemente avermelhados. Depois da coloração os

embriões foram desidratados em série crescente de etanol – 70%, 90% e 95% (10 minutos cada), 100% I e 100% II (15 minutos cada) – e diafanizados com dois banhos de xilol (10 minutos cada).

Para a realização da montagem em lâmina, o papel filtro foi retirado e os embriões foram cobertos com Bálsamo do Canadá e protegidos com lamínula de vidro, constituindo a montagem da lâmina permanente (**Figura 20 D**).

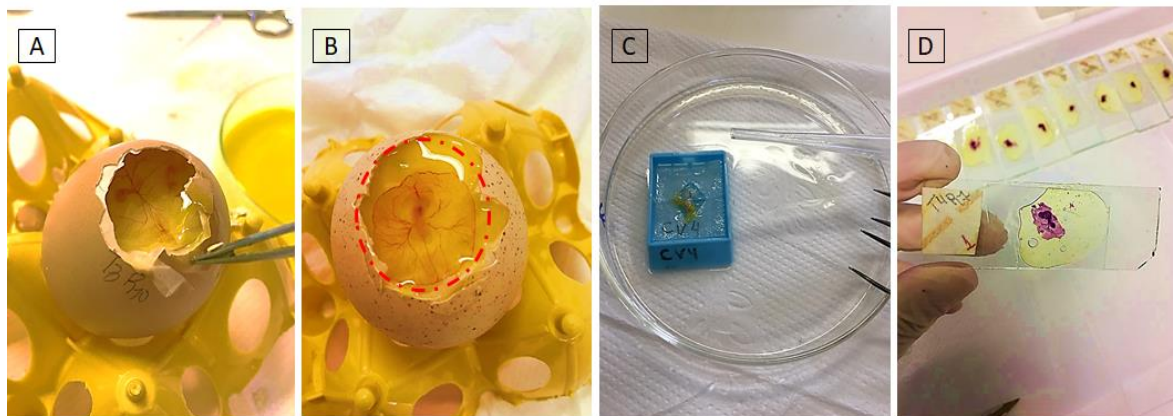


Figura 20-Coleta dos embriões para análise por montagem total. A: abertura do ovo, B: embrião (tracejado), C: Coleta e fixação em papel filtro, D: montagem em lâmina permanente. Fonte: o autor (2019).

As lâminas dos embriões foram avaliadas quanto aos aspectos morfológicos das vesículas encefálicas, vesículas ópticas, curvatura corporal, parede do corpo, tubo neural e região caudal. Essas estruturas foram selecionadas devido à facilidade de sua identificação nas lâminas de montagem total (**Figuras 20 e 21**). Os embriões com malformações foram aqueles que não apresentaram um padrão de organização corporal normal, sendo impossível identificar a maioria das estruturas e o estágio embrionário e foram contabilizados e classificados quanto a malformações específicas.

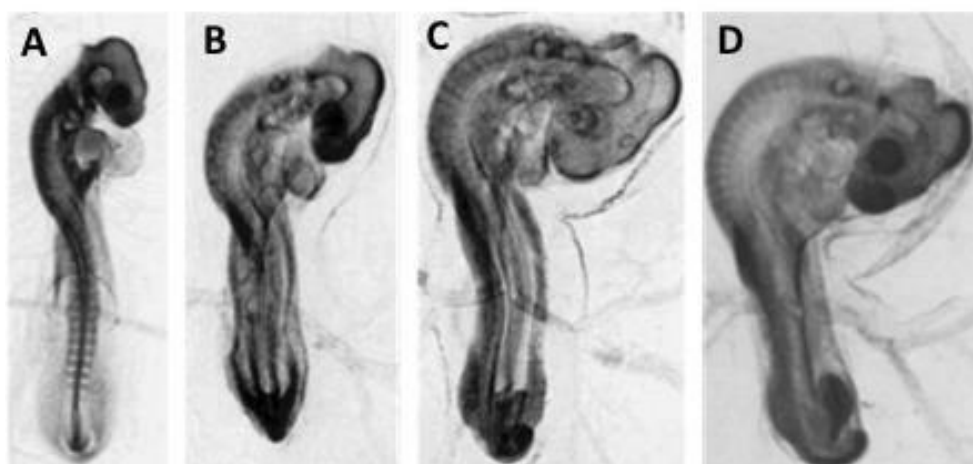


Figura 21-Embriões de 3 dias de desenvolvimento. A: Estádio 16. B: Estádio 17. C: Estádio 18. D: Estádio 19. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

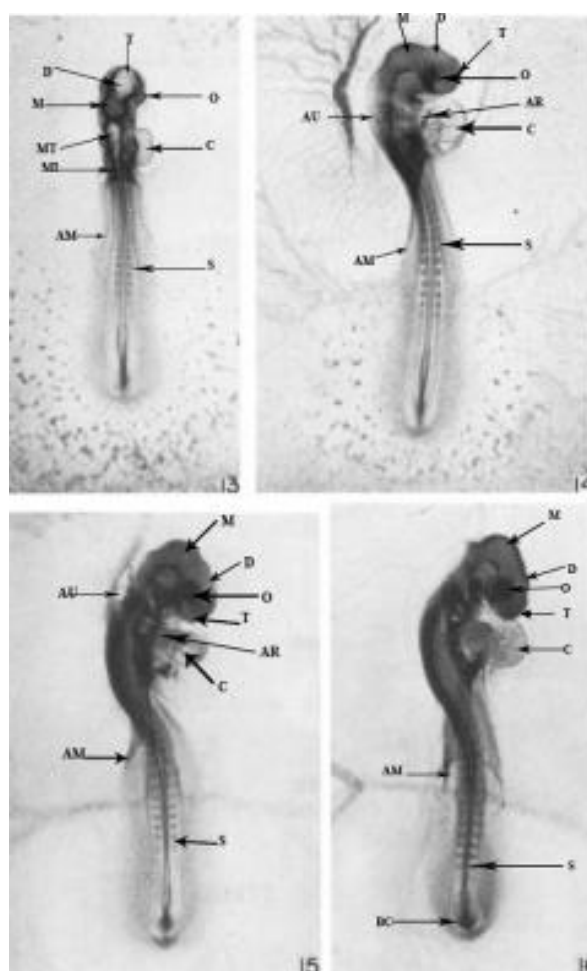


Figura 22- Embrões nos estádios embrionários 13, 14, 15 e 16. AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BC = Broto da cauda; C = Coração; D = Diencefalo; M = Mesencéfalo; MI = Mielencéfalo; MT = Metencéfalo; O = Vesícula óptica; S = Somitos; T = Telencéfalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

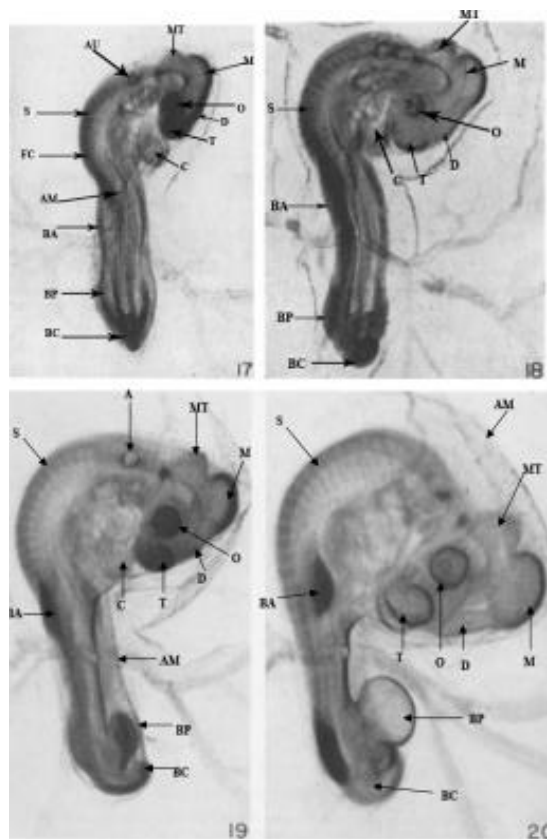


Figura 23- Embrões nos estádios embrionários 17, 18, 19 e 20. AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BA = Broto da asa; BC = Broto da cauda; BP = Broto da perna; C = Coração; D = Diencefalo; FC = Flexura cervical; M = Mesencéfalo; MT = Metencéfalo; N = Neuróporo anterior; O = Vesícula óptica; R = Romboencéfalo; S = Somitos; T = Telencéfalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

Os resultados não apresentaram uma distribuição paramétrica. Foi utilizado Software RStudio® e os pacotes “agricolae” (Statistical Procedures for Agricultural Research) e pacote “lme4” (Testing Linear Regression Model), para realização das análises. Os dados de viabilidade seguiram um modelo linear generalizado “glm” (binomial), e foram analisados pelo teste de Qui quadrado. Os dados de frequência cardíaca foram analisados pelo teste de Poisson. A análise dos dados referentes aos estágios de desenvolvimento embrionário também seguiram uma distribuição não paramétrica e foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, pela soma dos postos (ranks) das observações em cada grupo (estágios).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeito antifúngico dos filtrados do crescimento micelial

4.1.1 Efeito *in vitro*: determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Cogumelos do gênero *Ganoderma* são relatados como importante fonte de compostos antimicrobianos. Neste trabalho, os filtrados do crescimento micelial de *G. lucidum* submetido a eliciação com AS demonstraram efeito inibitório sobre o fungo patogênico *Erysiphe diffusa* na concentração mínima de 5 mg/mL. Fato este que pode estar relacionado com a presença de compostos com ação fungicida produzidos pelo *G. lucidum* em meio líquido quando eliciado por AS, já que quando utilizou-se somente o filtrado de *Ganoderma* não ocorreu efeito sobre o patógeno. Ainda com os resultados obtidos, podemos afirmar que tais princípios ativos são produzidos quando eliciados com agentes específicos. Esta modulação do metabolismo pôde ser observada mediante a eliciação com AS; já quando utilizou-se lignina como eliciador tal ação antimicrobiana não foi observada.

Além de *Ganoderma* + AS, o uso de oxiclreto de cobre (0,5-1,5 L/ha) demonstrou efeito inibitório mínimo de 10 mg/mL. Já é amplamente reconhecida a ação fungicida do oxiclreto de cobre sobre patógenos. Ainda, quanto ao fungicida a base de Azoxistrobina + Ciproconazol (0,3-1,5 L/ha); o fato de este não ter apresetado efeito fungicida, está relacionado à ação sistêmica destas substâncias na planta; ao contrário do oxiclreto, o qual possui ação protetora direta sobre o patógeno.

O fato de os demais FCM não apresentarem interferência no crescimento do fungo é uma evidência de que não apresentam efeito fungicida direto sobre o patógeno, porém este fato não descarta a possibilidade de algum dos compostos ser metabolizado pela célula vegetal e transformado em uma substância fungitóxica que controle a doença nas plantas.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) dos tratamentos sobre *Erysiphe diffusa*. UTFPR Campus Dois Vizinhos, 2019.

| Tratamentos | CIM (mg / mL ⁻¹) |
|-------------------------------|------------------------------|
| Água | - |
| AS | - |
| Lignina | - |
| oxicloreto de cobre | 10 |
| Azoxistrobina + Ciproconazol | - |
| Ganoderma 20% | - |
| Ganoderma +lignina 20% | - |
| Ganoderma + As 20% | 5 |

Fonte: o autor (2019).

O mecanismo da atividade antimicrobiana de *Ganoderma* sp. permanece em grande parte indefinido. Pesquisas apontam que esse efeito é devido à ação sinérgica de vários componentes diferentes; ou seja, a ação observada não decorre de apenas uma substância quimicamente ativa mas da ação de várias substâncias, como polissacarídeos, triterpenos, esteróis, adenosina, nucleotídeos, lectinas e outras proteínas (WASSER, 2014).

Dada a presença de um amplo espectro de agentes antimicrobianos, os filtrados do crescimento micelial submetidos a eliciações exibiram efeito antimicrobiano sobre oídio da soja *in vivo*. Estes resultados sugerem um grande potencial inovador, porque a maioria das pesquisas que precedem este estudo e que está relacionada a extratos de corpos de frutificação e micélio, relatam apenas a avaliação da atividade de polissacarídios isolados, e na sua grande maioria mencionando apenas seu potencial de inibir bactérias. Ainda são escassos os resultados acerca dos filtrados do crescimento micelial sobre fungos causadores de doenças em plantas; além disso, a maioria destes estudos foi realizada apenas *in vitro*.

Geralmente, os extratos aquosos e orgânicos de *G. lucidum* (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) demonstram ação bactericida, principalmente sobre *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O método de extração demonstra estar intimamente relacionado à ação inibitória dos extratos contra determinadas cepas de microrganismos (KAMRA; BHATT, 2012).

Heleno et al. (2013) relataram que o extrato metanólico apresentou maior atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* do que os antibióticos ampicilina e estreptomicina. Concentrações inibitórias mínimas estavam na faixa de 0,0125 a 0,75 mg/ mL e concentrações bactericidas de 0,035 a 1,5 mg/ mL. No entanto, a capacidade contra *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais fraca. O extrato de clorofórmio isolado do corpo frutífero de *Ganoderma lucidum* teve efeito inibitório frente a *Staphylococcus aureus* (8 mg/ mL) e *Bacillus subtilis* (8 e 16 mg/ mL). Os autores revelaram que uma variedade de derivados lipídicos, incluindo esteróis e ácidos triterpenóides estavam presentes no extrato de clorofórmio (KEYPOUR, 2008).

A extração com água quente do corpo de frutificação de *G. lucidum* cultivado e posterior fracionamento por precipitação com etanol e cromatografia em coluna de DEAE-celulose forneceram polissacarídeos capazes de inibir o crescimento de patógenos de plantas (*Erwinia carotovora*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*) e cinco microorganismos alimentares (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus nigricans*). A água é o meio mais comum para a extração polissacarídeos, que apresentam em sua extração principalmente as β -1,3-glucanas, e são geralmente responsáveis por sua atividade biológica e podem atuar como agentes *in vivo* (BAI et al., 2008).

Shahid et al, (2016) realizaram uma pesquisa para verificar o melhor extrato de *G. lucidum* contra fungos patogênicos de plantas (*Fusarium oxysporum* e *Alternaria alternata*) isolados de *Calendula officinalis* (calêndula). Quando fungos foram tratados com 20% de extrato metanólico, obteve-se a maior atividade antifúngica contra *F. oxysporum*, com 57% do seu crescimento inibido; para *A. alternata* foi reduzido até 52% em relação ao controle. O extrato de acetona demonstrou 52% de inibição contra *A. alternata* e 49% contra *F. oxysporum*, quando utilizado também na concentração de 20%. Com o uso do extrato aquoso, o crescimento de *F. oxysporum* reduziu em 40%. Em todas as técnicas os extratos apresentaram bons resultados.

Cilerdzic et al. (2016), foram alguns dos poucos pesquisadores que estudaram a atividade antimicrobiana e antioxidante dos filtrados do caldo de fermentação obtido de *Ganoderma lucidum*. As cepas demonstraram grande potencial antibacteriano, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nas concentrações apenas de 6,25% e 12,50%, respectivamente. Para *Aspergillus*

niger, *Penicillium cyclopium* e *Pseudomonas aeruginosa*, apenas na concentração de 100%. Os filtrados são novos agentes antioxidantes e antimicrobianos potentes que podem ser obtidos mais rapidamente e de forma mais barata.

Os exopolissacarídeos (EPS) obtidos de *G. lucidum* também apresentam potencial bactericida. O exopolissacarídeo contém vários compostos de alto peso molecular e possui propriedades adsorptivas e adesivas devido à presença de vários grupos de substâncias. A atividade antibacteriana do EPS de um meio basal e um meio de malte contra algumas espécies bacterianas foi avaliada, os dois meios mostraram a maior atividade contra o crescimento do *Bacillus cereus* ($23 \pm 0,61$ mm e $18 \pm 0,38$ mm), respectivamente (MAHENDRAN et al., 2013).

Trabalhos com o isolamento de proteínas e polissacarídeos também são mencionados. Uma proteína antifúngica chamada de ganodermina, isolada dos corpos frutíferos de *G. lucidum* inibiu o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Physalo sporapiricola*, com um valor de IC₅₀ de 15,2 mM, 12,4 mM e 18,1 mM, respectivamente (WANG; NG, 2006). Duas hidroquinonas ganomicinas A e B isoladas de *Ganoderma pfeifferi* foram eficazes para inibição bacteriana. Os valores de MIC dos compostos foram 25 µg / mL contra *Staphylococcus aureus* e 2,5 µg / ml contra *Micrococcus flavus*. No ensaio de difusão em ágar zona de inibição (ZOI) 15–25 mm / 100 µg/ para *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *M. flavus* (MOTHANA et al., 2000).

Smânia et al. (2003) isolaram três esteróides e cinco triterpenos do fungo *Ganoderma annulare* que foram fortemente efetivos contra os fungos *Microsporium cannis* e *Trychophyton mentagrophytes*. Sajeena e Marimuthu (2013) testaram formulação isolada de *Ganoderma* sp. (Ganosol 10EC a 0,25%), que apresentou efeito no controle de crescimento de patógenos *Rhizoctonia solani in vitro*. Um composto chamado de G_app7 foi isolado de *Ganoderma applanatum*, apresentou atividade anti-oomiceta semelhante à estrobilurina. Esse composto foi eficiente na inibição do crescimento e desenvolvimento do míldio causados por *Sclerospora graminicola* em milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). (JOGAIAH et al., 2016).

Os resultados desse trabalho demonstram que os compostos bioativos de *G. lucidum* têm o potencial de serem utilizados como agentes de controle biológico no controle de doenças de plantas. Ainda podem ser testados contra vários outros microorganismos e doenças de plantas. Logo, trabalhos futuros devem focar em ensaios *in vivo* em plantas e na extração de compostos conhecidos com

propriedades antimicrobianas. Uma melhor compreensão destes compostos é crucial para identificar os potenciais efeitos sobre várias doenças a campo.

4.1.2 Efeito *in vivo*: aplicação foliar em plantas de soja

Plantas de soja, quando pulverizadas com os FCM na concentração de 20 % v/v, apresentaram reduções da severidade de oídio em relação ao controle. Conforme demonstrado na Figura 4.1, pelo teste de Friedman, quanto maior a soma dos postos menor a severidade de doença nas folhas.

Nas quatro avaliações realizadas (2, 5, 7 e 10 dias), após a aplicação, ocorreram variações significativas entre os tratamentos; no entanto, de modo geral observou-se o efeito dos FCM e dos controles (fungicidas), demonstrando haver potencial dos FCM no controle da doença.

Na primeira avaliação, 2 dias após a aplicação dos tratamentos, os melhores resultados para redução da severidade foram observados pelo filtrado da eliciação com lignina, que não diferiu do fungicida Azoxistrobina + Ciproconazol (0,3-1,5 L/ha). O efeito desse filtrado se manteve até sete dias após a aplicação; após esse período o fungo voltou a colonizar o tecido foliar.

Na terceira e na quarta avaliação, respectivamente 7 e 10 dias após a aplicação, o tratamento com filtrado submetido a eliciação com AS evidenciou uma maior redução da severidade de doença nas folhas. Pôde-se perceber que sua ação foi crescente após a aplicação, isso sugere que o efeito tenha ocorrido devido à ativação de mecanismos de resistência da planta. O filtrado de *G. lucidum* sem eliciação também apresentou redução da incidência quando comparado com as folhas apenas tratadas com água.

Os resultados demonstraram o efeito curativo em plantas de soja infectadas por oídios, pela aplicação dos filtrados de cultura de *G. lucidum*. Estes filtrados reduziram significativamente a incidência de oídio quando aplicados na concentração de 20%. Não foi verificado efeito sistêmico dos FCM; a proteção foi local e pode estar relacionada à atividade antifúngica dos FCM, bem como à ativação de mecanismos de defesa da planta.

Embora se tenha observado uma proteção parcial das plantas de soja contra oídio, uma aplicação em toda a planta poderia vir a reduzir significativamente a incidência desta doença em lavouras de soja.

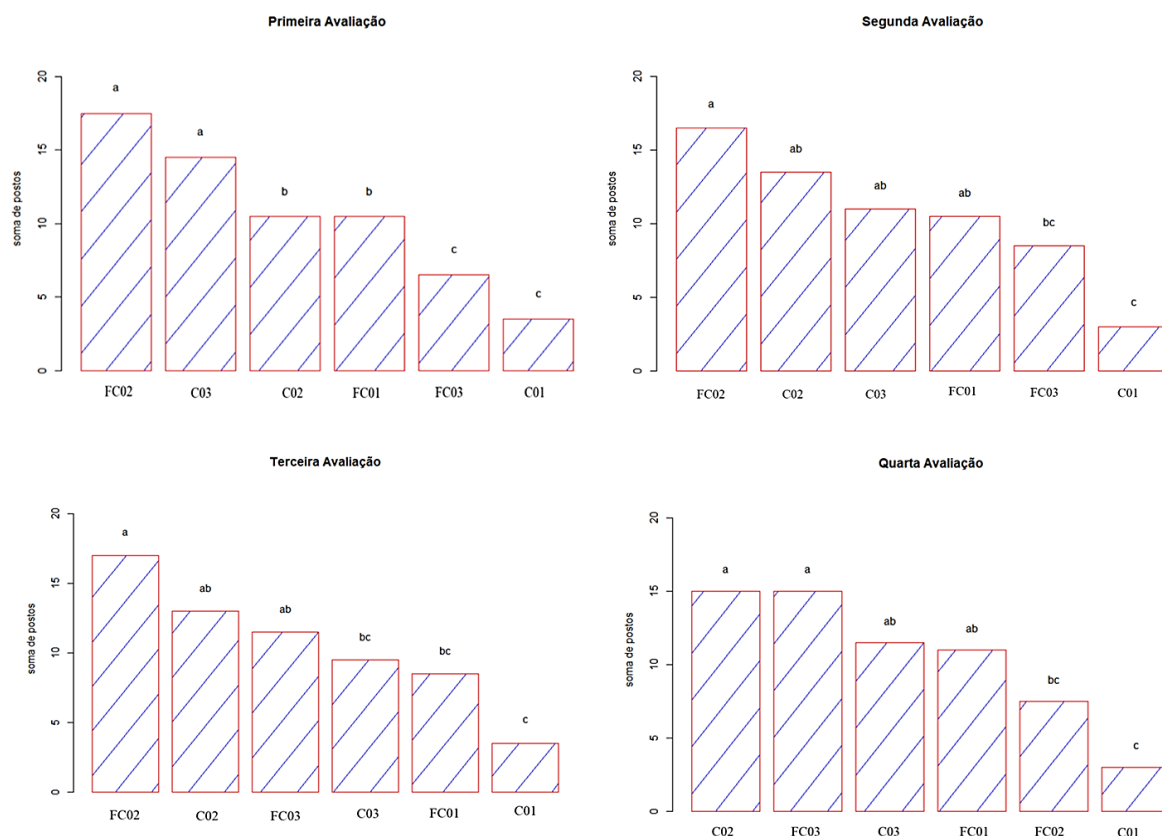


Figura 24- Soma dos postos para as notas de incidência de oídio na faixa do folíolo pulverizado, utilizando-se a escala de notas proposta, sendo: 0- sem controle; 1- baixo controle; 2- controle; S- sistêmico. As avaliações ocorreram em 2, 5, 7 e 10 dias após as aplicação, onde C01 - água destilada; C02 - oxiclreto de cobre .C03 - Azoxistrobina + Ciproconazol; F01 - filtrado do crescimento micelial de *G.lucidum* sem eliciação; FC02 - filtrado da eliciação com lignina; FC03 - filtrado da eliciação com AS. As avaliações de severidade de doença ocorreram a 2, 5, 7 e 10 dias após aplicação. Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos pelo teste de Friedman, onde os dados foram ordenados em ranks. Fonte: o autor (2019).

Nas quatro avaliações efetuadas os tratamentos com fungicidas diferiram significativamente da testemunha. Como já era de se esperar, constatou-se a eficiência de oxiclreto de cobre ,bem como do fungicida a base de Azoxistrobina + Ciproconazol.

Os fungicidas à base de cobre resultam em um bom controle da doença, no entanto eles podem acarretar fitotoxicidade, causando queima das folhas, desfolha e redução na produtividade, principalmente sob condições de temperaturas acima de 26 a 30°C (STADNIK; KOBORI; BETTIOL, 2001). Os fungicidas sistêmicos são os

mais eficientes e também os mais recomendados para o controle do oídio (STADNIK; KOBORI; BETTIOL, 2001).

O ingrediente ativo Azoxistrobina é um fungicida do grupo das estrobilurinas, o qual tem sido eficaz no controle das principais doenças da cultura do café e soja. Já os ingredientes ativos Tebuconazol e Ciproconazol do grupo químico dos triazóis atuam na formação da biossíntese do ergosterol e podem agir de forma protetora ou curativa, também proporcionam elevada fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos vegetais. Como efeito curativo apresentam elevada função residual, como protetores oferecem ação tóxica à germinação de esporos (RODRIGUES, 2009).

A eficácia dos extratos e filtrados de basidiomicetos no controle de doenças de plantas, por ação tanto direta quanto através da indução de resistência, vem sendo comprovada. Porém, ainda são poucos os trabalhos que testaram esses compostos a campo.

O extrato aquoso do substrato de *A. bisporus* reduziu significativamente a área foliar afetada pela sarna da macieira em relação à testemunha no trabalho realizado em campo (YOHALEM; NORDHEIM; ANDREWS, 1996). Os filtrados de cultura de *P. sanguineus* foram eficazes no controle de mancha angular do feijoeiro, causada por *Pseudocercospora griseola*. Os filtrados reduziram em 82 e 49% respectivamente a doença em casa de vegetação e no campo, em relação ao controle, que foi água (VIECELLI et al., 2009). Plantas de pepino tratadas com pulverização de extrato aquoso autoclavado do substrato de *L. decastes* e *Pleurotus eryngii* apresentaram redução significativa nos sintomas das doenças causadas pelos patógenos *Podosphaera xanthii*., *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e *Colletotrichum orbiculare* (PARADA et al., 2012).

4.2 Efeito na Indução de Resistências em plantas

4.2.1 Ativação de fitoalexinas em cotilédones de soja

Os resultados do bioensaio para a produção de gliceolinas em cotilédones de soja tratados com os filtrados de *G. lucidum* estão apresentados na **Tabela 2**. Todos os tratamentos com FCM elevaram a expressão da atividade de fitoalexinas em

relação à testemunha. O filtrado de *G. lucidum* submetido a eliciação com AS nas concentrações de 10% e 20% foram os tratamentos que induziram o maior acúmulo de gliceolinas; o filtrado da eliciação com lignina utilizado a 20% também demonstrou efeito semelhante.

Foi observado o acúmulo de gliceolinas a partir da concentração de 5% de todos os filtrados, quando comparados com as testemunhas. A expressão de respostas de defesa foi relacionada à dose dos elicitores. Ou seja, ocorreu maior acúmulo de fitoalexinas com o aumento das concentrações dos filtrados. Os compostos oxicloreto de cobre (0,5-1,5 L/ha) e Azoxistrobina + Ciproconazol (0,3-1,5 L/ha) não apresentaram efeito na indução de gliceolinas em soja.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, sintetizadas pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. O acúmulo de fitoalexinas, tal como a ativação de outros mecanismos de defesa, ocorre em resposta ao reconhecimento de moléculas elicitoras (SMITH, 1996). Extenso número de espécies moleculares pode funcionar como moléculas elicitoras para a síntese de fitoalexinas, como oligossacarídeos, proteínas e polipeptídeos, ácidos graxos, óleos essenciais e muitos outros compostos bióticos ou abióticos. Na literatura não há relatos sobre o uso de *G. lucidum* como elicitador de respostas de defesa vegetal. Neste trabalho foi comprovada a eficiência dos FCM de *G. lucidum* como moléculas elicitoras para a síntese de gliceolinas em plantas de soja

Tabela 2. Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja pelos FCM de *G. lucidum* submetidos a diferentes tratamentos de eliciação. UTFPR – Campus Dois Vizinhos, 2019.

| Tratamentos | Fitoalexinas Abs (285nm/g.p.f.) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Ganoderma +AS 20% | 0,285 a |
| Ganoderma +AS 10% | 0,269 a |
| Ganoderma + Lignina 20% | 0,237 a |
| Ganoderma + As 5% | 0,221 b |
| Ganoderma + Lignina 10% | 0,218 b |
| Ganoderma + Lignina 5% | 0,208 b |
| Ganoderma 10% | 0,199 b |
| Ganoderma 20% | 0,198 b |
| Ganoderma 5% | 0,165 b |
| Ganoderma + Lignina 2% | 0,104 c |
| Ganoderma + As 2% | 0,092 c |
| oxicloreto de cobre | 0,087 c |
| Azoxistrobina + Ciproconazol | 0,075 c |
| Ganoderma 2% | 0,054 c |
| Água destilada | 0,047 c |

CV = 19.32 %

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,5$). **Fonte: Autor (2019).**

Por sua vez, em soja a gliceolina (um pterocarpano derivado de um isoflavonoide produzido por espécies da família Fabaceae), é uma molécula importante nas interações da planta com fitopatógenos. São sintetizadas a partir de precursores glicosilados. Quando o tecido vegetal é atacado por um patógeno, ou tratado com elicitor, os precursores sofrem alterações em suas moléculas, originando as fitoalexinas. O aumento na concentração de fitoalexinas ocorre em células bem próximas ao ponto de penetração. Já nas células mais distantes, ocorre um aumento na síntese dos precursores e essas ficam em estado de alerta (GRAHAM, 1995).

O modo de ação das fitoalexinas sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e na alongação do tubo germinativo e na redução ou na inibição do crescimento micelial (CAVALCANTI et al., 2005, SMITH, 1996).

O tratamento elicitor leva à planta a um estado de alerta chamado de “primming”, que torna a resposta de defesa mais rápida e intensa no momento em

que ocorre o contato com o patógeno (CONRATH et al., 2006). Segundo Fauth et al. (1996), o fermento causado nesse tipo de bioensaio é suficiente para condicionar os tecidos cotiledonares, e o tratamento subsequente com o indutor faz o papel do patógeno, levando à síntese de compostos de defesa. Assim o tratamento de cotilédones de soja com os FCM faz com que ocorra a síntese de fitoalexinas sem a necessidade de contato com o patógeno.

Trabalhos semelhantes foram realizados, Arruda et al., (2012) demonstraram que os extratos de cogumelos *Agaricus blazei* (= *A. subrufescens*), *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* na concentração de 20% v/v exibem efeito sobre *Erysiphe diffusa* e também indução de resistência na ativação de fitoalexina (gliceolina) *in vitro*. Fiori-Tutida (2003) obteve resultado semelhante na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo, utilizando diferentes isolados de *A. blazei* (= *A. subrufescens*) e *L. edodes*. Beninca (2007) observou a extração com diclorometano, hexano e etanol de basidiocarpos de *P. sanguineus* não ativaram a síntese de fitoalexina gliceolina, mas sim a síntese de deoxiantocianidinas em sorgo.

Meinerez et al. (2007) verificaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* apresentam potencial indutor de resistência em cotilédones de soja pela síntese de fitoalexinas e também pelo aumento na atividade de peroxidase. Da mesma forma Pazuch (2007) verificou que extratos aquosos de basidiocarpos, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. Em estudos realizados por Piccinin (2000), as preparações de *L. edodes* induziram a produção de fitoalexinas do complexo das deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo e de gliceolinas em cotilédones de soja. Da mesma forma, os filtrados do crescimento micelial e estipe do cogumelo foram eficientes na redução de infecções locais e sistêmicas por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujazeiro.

Com base nos resultados deste trabalho é possível afirmar que os filtrados de *Ganoderma lucidum* possuem capacidade de induzir a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja, apresentando especificidade de ativação da defesa vegetal em função das concentrações e produtos utilizado na eliciação.

4.2.2 Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa

4.2.2.1 Proteínas totais

No experimento conduzido no patossistema soja/oídio em casa de vegetação, objetivou-se avaliar a atividade enzimática entre diferentes tratamentos eliciadores, em tempos de coleta de materiais vegetais. Conforme a **Tabela 3**, verificou-se que os valores de proteínas aumentaram significativamente nas plantas tratadas com FCM e inoculadas com oídio, quando comparados à testemunha e ao controle com fungicidas.

Esse aumento significativo na quantidade de proteínas indica que os filtrados possuem ação sobre o metabolismo primário das plantas. O acúmulo de proteína em plantas de soja teve início 48 horas após o tratamento com o filtrado submetido a eliciação com AS e se manteve crescente até 192 hpa. De maneira geral, todos os FCM estimularam o aumento na concentração de proteínas em plantas de soja a 192 hpa quando comparados com a testemunha. Não houve diferença estatística entre as testemunhas, nas quais foi aplicado apenas água, e as plantas que receberam aplicação de fungicida à base de oxicloreto de cobre.

O aumento no teor de proteínas no tecido vegetal desafiado com um patógeno ou tratado com eliciadores pode indicar a ativação dos mecanismos de defesas. Moléculas elicitoras estimulam respostas de defesa em plantas, resultando na síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas).

As proteínas são polímeros de aminoácidos, esses aminoácidos são precursores para muitos metabólitos de plantas relacionados à defesa. Também apresentam funções estruturais e dinâmicas e participam em diversas reações bioquímicas como catalisadores enzimáticos. Entre as proteínas, há as relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) as quais são induzidas nos tecidos vegetais em função da inoculação com patógenos/ microrganismos, sistemicamente ou localmente (GUZZO, 2004).

Tabela 3 – Proteínas totais (mg.g tecido⁻¹) de plantas de soja tratados com FCM de *G. lucidum* e oxiclreto de cobre. UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019.

| Tempo (horas) | Tratamentos | | | | |
|---------------|-------------|----------|---------|----------|------------------|
| | Controle | Gano | GanoAS | GanoLig | Oxicloreto cobre |
| 0 | 1,79 aB | 2,26 aB | 1,83 aB | 2,11 aAB | 2,31 aA |
| 48 | 2,00 aA | 1,95 aB | 2,17 aA | 1,84 aB | 1,93 aAB |
| 96 | 1,52 bAB | 2,21 abB | 2,36 aA | 2,43 aAB | 1,62 bAB |
| 192 | 1,99 bA | 2,98 aA | 2,53 aA | 2,80 aA | 1,51 cB |

CV = 17.90 % *CV = 19.59 %

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Coeficiente de variação dos tratamentos. ** Coeficiente de variação das datas de coleta. **Fonte: o autor, 2019.**

A indução de resistência em plantas pode ser desencadeada por vários elicitores, entre eles os filtrados do crescimento micelial de *G. lucidum*. Os compostos presentes no filtrado podem atuar como elicitores que irão se ligar a receptores na membrana plasmática da célula vegetal; posteriormente esse sinal é transmitido no interior da célula, ativando mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, resultando na indução de resistência a fitopatógenos (ARRUDA et al., 2012).

Entre os potenciais indutores de resistência encontram-se os cogumelos comestíveis e medicinais. Em trabalho realizado por Viecelli et al. (2009), foi observado que em plantas de feijão tratadas com filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola* houve aumento nos teores de proteínas. Kuhn (2007) observou uma redução no teor de proteínas em plantas de feijão quando tratadas com *Bacillus cereus*, uma tendência contrária ao tratamento com acibenzolar-S-metil, demonstrando a especificidade na resposta fisiológica da planta.

4.2.2.2 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Em relação à atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas de soja tratadas e inoculadas com *Erysiphe diffusa*, os resultados apresentados na **Tabela 4** demonstram que as plantas tratadas com os FCM apresentaram maior atividade da enzima em comparação com plantas não tratadas.

Houve um aumento expressivo da síntese dessa enzima em 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Esse rápido incremento em plantas tratadas e não tratadas pode estar relacionado à ativação da resistência induzida pela colonização do patógeno, que ocorre 24 horas após o tratamento das plantas, o qual possivelmente serviu como eliciador.

O fungo, após inoculação nas plantas, demora cerca de 6 a 10 horas em média para germinar, formar o apressório e colonizar o tecido vegetal; as respostas do hospedeiro ocorrem durante este tempo, incluindo algumas respostas bioquímicas que podem influenciar o resultado do encontro iminente entre o apressório e a célula hospedeira. Após quatro a cinco horas da inoculação, as atividades de três enzimas chaves envolvidas no metabolismo secundário da planta podem ser expressadas. São elas: fenilalanina amônia-liase (FAL), tirosina (TAL), peroxidase e fitoalexinas (GREEN et al., 1975).

A atividade da enzima FAL foi pronunciada a 192 horas após a aplicação do filtrado de Ganoderma + AS. Para os demais tratamentos, os valores foram inferiores e reduzindo com o passar do tempo. Assim é pertinente supor que a ativação dessa enzima nas plantas tratadas foi mais tardia se compararmos com as plantas não tratadas. Isso sugere que os FCM de *G. lucidum* são elicitores eficientes para síntese da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas de soja

Os resultados expostos nesse trabalho confirmam que os FCM de *G. lucidum* possuem ação sobre o metabolismo secundário da planta ativando a rota dos fenilpropanóides. Sendo assim, a aplicação dos FCM em plantas de soja conduz à expressão da enzima FAL e subsequente aumento das respostas de defesa contra o oídio.

Tabela 4 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg./g.tecido) em plantas de soja tratadas com FCM de *G. lucidum* e oxicloreto de cobre. UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019.

| | Tratamentos | | | | |
|-----|-------------|-----------|-----------|------------|------------------|
| | Controle | Gano | GanoAS | GanoLig | Oxicloreto cobre |
| 0 | 0,0073 aB | 0,0068 aB | 0,0079 aC | 0,0067 aC | 0,0059 aB |
| 48 | 0,0131aA | 0,0139 aA | 0,0138 aB | 0,0120 aB | 0,0140 aA |
| 96 | 0,0104aAB | 0,0101 aB | 0,0143 aB | 0,0144 aAB | 0,0131 aA |
| 192 | 0,0079 cB | 0,0151 bA | 0,0216 aA | 0,0162 bA | 0,0150 bA |

CV = 30.01 % *CV = 18.61 %

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Coeficiente de variação dos tratamentos. ** Coeficiente de variação das datas de coleta. **Fonte: o autor (2019).**

Fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima do metabolismo dos fenilpropanóides na maioria das plantas, e tem sido indicada pelo seu importante papel no controle de acúmulo de compostos fenólicos em resposta à infecção. A biossíntese de AS, assim como a da maioria dos compostos fenólicos nas plantas, depende da biossíntese de fenilalanina que é sintetizada a partir da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato, através de uma série de reações que compõem a via do Shikimato/Arogenato (STRACK, 1997). É uma enzima muito estudada em virtude da sua importância chave no metabolismo primário e secundário das plantas.

Em todas as rotas metabólicas são produzidos intermediários que alimentam outras vias. No caso dos fenilpropanóides, o aumento da FAL leva a aumento da síntese de fenilalanina que por sua vez, pode levar a aumento da concentração de coumarato. O coumarato pode tanto continuar na via dos fenilpropanóides e levar a incremento na síntese de lignina (associado a aumento na atividade de peroxidases), como pode ser desviado para a produção de hidroxibenzoatos, flavonóides ou outros fenóis (LABANCA, 2002). Ou seja, o aumento da enzima FAL não necessariamente sempre resultará no aumento de compostos fenólicos e peroxidases.

Alguns trabalhos correlacionam a aplicação de compostos de cogumelos com a atividade da enzima FAL. Baldo (2008) observou que a aplicação de extratos de *P. sanguineus* em plantas de feijão provocou aumento local e sistêmico na atividade específica de fenilalanina amônia-liase. Almeida et al. (2012) também verificaram a

maior ativação da FAL em 168 horas em soja quando inoculado com fungo *P. pachyrhizi*. Polissacarídeos de *L. edodes*, eficientes contra a mancha bacteriana, não ativaram a enzima fenilalanina amônia-liase em tomateiros, contudo o tratamento com polissacarídeos aumentou a atividade de peroxidases e o conteúdo de fenóis totais (AGUIAR, 2016).

4.2.2.3 Fenóis totais

Conforme os resultados demonstrados nesse trabalho, a ativação de repostas de defesa foi visualizada através de aumentos na atividade da enzima FAL e também pelo acúmulo de compostos fenólicos totais em plantas de soja.

Os resultados para fenóis totais mostraram uma tendência semelhante aos de ativação da enzima FAL. Conforme a Tabela 5, houve maior teor de compostos fenólicos totais em plantas tratadas com filtrado Ganoderma + lignina em 48 horas após a aplicação e 24 horas após a inoculação do patógeno, quando comparado com as plantas não tratadas e aos demais tratamentos.

Por outro lado, após esse pico de ativação os teores de fenóis foram reduzindo. Essa redução na concentração dos fenóis pode estar relacionada à síntese de peroxidases como mecanismo de defesa. De acordo com Kuhn e Pascholati (2010) a redução dos compostos fenólicos pode ter ocorrido principalmente à medida que as células foram se tornando lignificadas, uma vez que compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina pela ação de peroxidases. Assim, a subsequente redução no teor de fenóis seria consequente ao maior teor de peroxidases nas plantas tratadas.

Para o tratamento com filtrado Ganoderma + AS os resultados também se assemelham aos encontrados para a enzima FAL, obtendo um maior acúmulo de fenóis a 192 horas após a aplicação, enquanto houve uma redução para demais tratamentos.

Tabela 5– Compostos fenólicos (mg.g tecido⁻¹) de plantas de soja tratadas com FCM de *G. lucidum* e oxicloreto de cobre. UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019.

| Tempo (horas) | Tratamentos | | | | |
|---------------|-------------|---------|---------|---------|------------------|
| | Controle | Gano | GanoAS | GanoLig | oxicloreto cobre |
| 0 | 0,39 aB | 0,41aB | 0,37 aC | 0,34 aC | 0,33 aB |
| 48 | 0,86 bA | 1,02 bA | 0,92 bB | 1,37 aA | 0,77 bA |
| 96 | 0,88 aA | 1,08 aA | 0,94 aB | 0,94 aB | 0,77 aA |
| 192 | 0,65 cB | 1,07abA | 1,26 aA | 0,99 bB | 0,91 bcA |

*CV=21.46% ***CV=21.62%

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Coeficiente de variação dos tratamentos. ** Coeficiente de variação das datas de coleta. **Fonte: o autor (2019).**

Compostos fenólicos estão diretamente ligados à expressão da rota das peroxidases, que participam de vários processos fisiológicos de grande importância na planta. Seu rápido acúmulo, oxidação e polimerização no local da infecção podem limitar o desenvolvimento do patógeno. Nesse processo os fenóis são oxidados pela ação do peróxido de hidrogênio e polimerizados para formação de lignina. Essa lignina é depositada na parede celular. O reforço da parede celular vegetal aumenta a resistência das plantas a enzimas/toxinas degradadoras produzidas pelos patógenos e atua como barreira física, reduzindo a severidade dos sintomas (STRACK, 1997).

Os fenóis podem ocorrer em células vegetais na sua forma livre, na forma ligada à parede celular, ou ainda, conjugado para a formação de ésteres, amidas ou glicosídeos (STRACK, 1997). Os fenóis livres são facilmente extraídos pelo uso de metanol e os ligados por uma reação de esterificação com NaOH (Hidróxido de sódio) (KOFALVI, NASSUTH, 1995). No entanto, a ligação por laço glicosídico é estável às bases, requerendo hidrólise ácida ou tratamento com glucosidases para liberação da porção fenólica (HRAZDINA et al., 1997).

Nesse trabalho só foram avaliados os fenóis livres. Assim, a redução na expressão de fenóis também pode ter ocorrido devido a alterações que levaram ao aumento rápido da concentração de fenóis tanto livres quanto ligados à parede celular, que não foram quantificados. Também pode ter ocorrido uma rápida

polimerização para formação de lignina e ligação à parede, o que levou à insolubilização dos fenóis livres, e assim, uma redução na quantificação em laboratório nas horas subsequentes (LABANCA, 2002). Para uma confirmação coerente sobre essa hipótese seria imprescindível a determinação da concentração dos fenóis conjugados e da lignina na parede celular da planta. Uma avaliação via microscópio sanaria essa dúvida, e eventualmente confirmaria a incorporação de fenóis à parede celular.

O aumento da atividade de compostos fenólicos observado nos períodos após a inoculação do patógeno pode estar relacionado, além da ação elicitora de FCM, bem como pelo contato com o patógeno. O simples contato, na superfície foliar, do patógeno, já é capaz de estimular a planta a exibir respostas de defesa (KÄSTNER et al., 1998). As hifas de fungos biotróficos podem crescer tanto intercelularmente como intracelularmente. Muitos patógenos fúngicos biotróficos, como ferrugem e oídio, formam estruturas de alimentação especializadas chamadas haustórios. Nessas estruturas, uma interface contendo carboidratos e proteínas é desenvolvida entre a parede da célula e a membrana plasmática da planta, o que facilita a troca de sinais e nutrientes entre fungos e hospedeiros (HAHN; MENDGEN, 2001; MENDGEN; HAHN, 2002).

As repostas das plantas aos patógenos são caracterizadas pelo acúmulo precoce de compostos fenólicos no sítio de infecção (reação de hipersensibilidade). O simples contato na superfície foliar do patógeno, já é capaz de estimular a planta a exibir respostas de defesa. O papel da reação de hipersensibilidade em interações com patógenos biotróficos, como é o caso do oídio, é grande, já que esses patógenos formam associações haustoriais íntimas com as células hospedeiras, causando a morte celular no sítio de infecção, pode impedir que estes tenham acesso a nutrientes, o que os levaria à morte (HAMMERSCHMIDT, 1992).

Em trabalho realizado por Tarsis (2016), também houve aumento do teor de compostos fenólicos totais após o tratamento com polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (1,5 mg/mL) e inoculação com *X. gardneri*. Resultados semelhantes foram encontrados por Coqueiro et al. (2011), que mostraram a capacidade do polissacarídeo quitosana (3 mg/mL) em reduzir a severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em plantas de tomate. O mecanismo desta atividade está relacionado à compostos fenólicos, envolvidos em mecanismos bioquímicos e estruturais de defesa da planta, sintetizados em resposta

contra a infecção. Mandal et al. (2011) relataram que o conteúdo de fenólicos totais e deposição de lignina foram significativamente maiores em plantas de tomate resistentes inoculadas com *Ralstonia solanacearum* em comparação com plantas de tomate suscetíveis inoculadas

4.2.2.4 Peroxidases

Nas avaliações bioquímicas realizadas observaram-se alterações na atividade de Peroxidases. Os resultados da **Tabela 6** confirmam o que foi exposto nos resultados anteriores, sendo que a atividade de peroxidases foi estimulada a 48 horas após a aplicação e 24 horas após a inoculação com o patógeno para todos os tratamentos com os FCM, semelhante aos dados de compostos fenólicos totais.

A expressão dessa enzima foi crescente e teve seu máximo acúmulo a 192 hpa para todos os tratamentos com FCM. As análises bioquímicas realizadas a partir de folhas de soja mostraram que as peroxidases são bons marcadores de resistência frente ao patossistema em questão, já que houveram diferenças no acúmulo dessas enzimas entre plantas tratadas com FCM e plantas tratadas apenas com água.

O aumento da atividade de peroxidases verificado não foi acompanhado de aumento na concentração de fenóis, como era inicialmente esperado (já que os fenóis servem como substrato para esta enzima). No entanto, outros trabalhos verificaram que o aumento da atividade de peroxidases não implica, necessariamente, em aumento na concentração de fenóis.

De acordo com Soyly et al. (2003) durante as interações incompatíveis entre planta-microorganismos ou tratamentos com elicitores, aumentos na atividade peroxidases são frequentemente associados com a incorporação progressiva de compostos fenólicos na parede celular. O reforço da parede celular vegetal aumenta a resistência das plantas à enzimas/toxinas degradadoras produzidas pelos patógenos e atua como barreira física, reduzindo a severidade dos sintomas.

Tabela 6 – Atividade de peroxidases (unidade enzimática.minuto⁻¹) de plantas de soja tratadas com FCM de *G. lucidum* e oxicloreto de cobre UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019.

| Tempo(horas) | Tratamentos | | | | |
|--------------|-------------|----------|-----------|-----------|------------------|
| | Controle | Gano | GanoAS | GanoLig | oxicloreto cobre |
| 0 | 15,89 aB | 17,33 aB | 17,49 aC | 16,33 aC | 17,08 aBC |
| 48 | 17,93 bB | 29,92 aA | 26,55 aB | 24,10 aB | 12,57 bC |
| 96 | 15,76 cB | 31,74 aA | 28,72abAB | 29,43abAB | 24,131bA |
| 192 | 23,82 bA | 31,54 aA | 33,54 aA | 32,30 aA | 22,46 bAB |

CV = 12.61% *CV = 14.74 %

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Coeficiente de variação dos tratamentos. ** Coeficiente de variação das datas de coleta. **Fonte: o autor (2019).**

Mudanças na atividade das peroxidases são correlacionadas à resposta de resistência em diferentes patossistemas. As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina (CAVALCANTI et al., 2005).

Sua atividade contribui em vários processos relacionados à defesa de plantas, incluindo reações de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexinas. O reforço da parede celular da planta com lignina e fenóis aumenta a resistência à degradação enzimática da parede celular causada por patógeno e atua como uma barreira mecânica à entrada de toxinas e à penetração através do protoplasto (PASCHOLATI, 2011).

A indução da atividade de POD tem sido verificada em outros patossistemas quando se testam compostos naturais para o controle de doenças. Ao utilizar extratos do cogumelo *Lentinula edodes* em pepino para controle de *Colletotrichum lagenarium*, Di Piero e Pascholati (2003) verificaram elevação na síntese de peroxidases e quitinases. Também Silva et al. (2007) observaram que a atividade das peroxidases foi aumentada com a aplicação de extrato aquoso de *L. edodes* em tomateiro e também reduzindo a murcha bacteriana. Plantas de berinjela também obtiveram a atividade das peroxidases aumentada após aplicação de extrato de *A. blazei* (= *A. subrufescens*) e redução da ocorrência de folhas murchas por *Ralstonia solanacearum* (SILVA et al., 2008).

Em trabalho testando os filtrados de cultura de *P. sanguineus* para ativação de mecanismos de defesa em feijoeiro, os autores demonstraram que os teores de peroxidase, polifenoloxidase e os teores de proteínas e clorofilas foram maiores nas plantas tratadas (VIECELLI et al., 2009). Para Meinerez et al. (2007) o extrato bruto do basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* na concentração de 5% promoveu um aumento na atividade de peroxidases de 41%, em cotiledones de soja. Beninca (2007) verificou que o extrato diclorometanólico para sorgo e soja e etanólico para soja inibem a atividade de peroxidase, enquanto que o extrato hexânico promove a atividade para sorgo e a atividade específica para soja.

Outros autores também correlacionam a ativação de peroxidases com o tempo de expressão dessa enzima. Antonio et al. (2010) também observaram que linhagens resistentes de feijão contra *Sclerotinia sclerotiorum* apresentaram aumento na atividade da enzima de defesa peroxidase após 4h de inoculação do patógeno, ressaltando que a atividade dessa enzima quando comparada com a linhagem suscetível continuou alta até 168h após a inoculação. Almeida et al. (2012) observaram que 12h após a inoculação de *Phakospora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, genótipos resistentes e suscetíveis apresentaram atividade da 66 peroxidase superior ao tratamento controle, que são plantas em que não foram inoculadas com o patógeno.

Muitos trabalhos também correlacionam o aumento de atividade da enzima POD e redução de doença. Garcia (2014) verificou que suspensão obtida do micélio de *A. brasiliensis* (= *A. subrufescens*) além de efeito fungitóxico a *Plasmopara vitícola*, também induziu aumento na atividade de peroxidases em 48, 72 e 96 horas após aplicação dos tratamento em videiras. Também houve redução da AACPD do míldio da videira. Para Kuhn (2007), a atividade de peroxidase em feijoeiro variou em função do tempo, do número de aplicações e do indutor. O indutor ASM (acibenzolar-S-methyl) promoveu aumento da atividade de forma mais acentuada e mais rápida que o indutor biótico *Bacillus cereus*. Luiz et al. (2015; 2012) relataram um aumento significativo na atividade de peroxidases em plantas de tomate, reduzindo a severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*), após a aplicação de polissacarídeo de *Aloe* em suspensão (1,5 mg / mL) nas folhas, sem efeito antimicrobiano contra o patógeno. Esses resultados demonstram o potencial indutor desses cogumelos.

4.2.2.5 Quitinase

Observando-se a **Tabela 7**, verifica-se que a aplicação do filtrado de cultura de *G. lucidum* submetido a eliciação com lignina provocou um aumento expressivo de quitinase a 48 e 96 horas após a aplicação dos FCM, no entanto ocorreu uma redução dos valores após esses períodos.

Nesse trabalho os dados para a atividade da enzima β -1,3 glucanase não apresentaram uma significancia estatística. Isto pode significar que a rota de defesa através da ativação das glucanases não é uma rota de preferência no patossistema soja/oídio. Muitos trabalhos demonstram a ativação da enzima quitinase ou glucanase, sendo comum a preferência por uma destas enzimas para expressão imediata pela planta. No entanto, efeitos sinérgicos também são demonstrados.

Os dados apresentados condizem com resultados obtidos para as enzimas FAL, peroxidases e compostos fenólicos. Houve um maior acumulo de quitinase a partir de 192 hpa para o tratamento do filtrado de *Ganoderma* + AS. Os resultados levam a crer que a eliciação de *G. lucidum* em meio líquido com AS estimula o fungo a produzir compostos bioativos que, quando aplicados nas plantas, são capazes de induzir a resistência

Muitos estudos com tratamento de plantas com AS confirmam à sua função como uma molécula de sinalização durante as respostas de defesa das plantas a estresses abióticos e bióticos, e seu papel no aumento da produção de metabólitos secundários em plantas . No entanto a função do AS em microrganismos ainda não é bem compreendida. Em *G. lucidum* , já foi relatado que o tratamento com AS pode aumentar o acúmulo de ácido ganodermico um potente metabólito secundário. Esses resultados indicam que AS pode induzir a biossíntese de metabólitos secundários em fungos (CAO, 2017). E que esses metabólitos secundários produzidos por *G. lucidum* apresentam potencial para redução de doenças em plantas.

Tabela 7 – Atividade de quitinase (UAbs.min-1mg proteína-1) de plantas de soja, tratadas com FCM de *G. lucidum* e oxiclreto de cobre UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2019.

| Tempo(horas) | Tratamentos | | | | |
|--------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------------|
| | Controle | Gano | Gano AS | GanoLig | Oxiclreto cobre |
| 0 | 0,033 aA | 0,024 aB | 0,044 aB | 0,048 aC | 0,042 aB |
| 48 | 0,066 abA | 0,080 abB | 0,045 bB | 0,127 aB | 0,054 abB |
| 96 | 0,076 bA | 0,085 bB | 0,294 aA | 0,228 aA | 0,131 bA |
| 192 | 0,041 cA | 0,163 bA | 0,280 aA | 0,161 bAB | 0,081 cAB |

CV = 52.340 *CV = 37.73 %

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Coeficiente de variação dos tratamentos. ***Coeficiente de variação dos tempos de coleta. **Fonte: o autor (2019).**

A quitinase e a β -1,3 glucanase são enzimas hidrolíticas que, na maioria das vezes, atuam em sinergismo. Enzimas hidrolíticas (quitinase, glucanase, protease e celulase) são responsáveis pela lise de fitopatógenos através do hiperparasitismo. As propriedades antagônicas de enzimas hidrolíticas contra vários fitopatógenos apresentam um papel importante no biocontrole. Essas enzimas são capazes de quebrar ligações glicosídicas em quitina. Portanto, eles desempenham um papel vital no controle de muitas doenças de plantas, degradando as paredes celulares dos fitopatógenos (KIM et al. 2003, VAN LOON et a., 1994; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

O aumento da atividade da enzima quitinase para o tratamento com o filtrado de *G. lucidum* submetido a eliciação com lignina pode ser decorrente de um reconhecimento da planta via padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Onde a planta pode ter reconhecido a lignina, utilizada na eliciação a *G. lucidum* em meio líquido, como um componente que foi degradado da sua própria parede celular e assim ativando um sinal de infecção por patógeno.

A categoria de eliciadores mais recentemente descoberta são os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), indicadores endógenos de lesão. Moléculas que desempenham um papel no metabolismo 'normal' da planta indicam danos quando eles, ou seus fragmentos, aparecem fora de uma célula devido à ruptura do tecido e, em seguida, podem agir como ativadores do sistema imunológico

de plantas. Pesquisas demonstram resultados satisfatórios com extratos preparados a partir de algas, folhas ou outras partes de plantas, bem como lisados de proteínas (CHOI; KLESSIG, 2016; GUST et al., 2017).

Alguns trabalhos demonstram a ativação de quitinases e glunacanases com o uso de compostos alternativos como elicitores. Di Piero et al(2004) relatou que a aplicação do extrato aquoso de basidocarpos de *L. edodes* em pepino provocou um acúmulo local e sistêmico de peroxidases e quitinases, mas não de glucanases. Os autores também observaram que após a inoculação com *C. lagenarium*, plantas pré-tratadas tenderam a ter diminuição na atividade de quitinases em comparação àquelas tratadas que não foram inoculadas. Fiori-Suzuki et al. (2008) verificaram aumento na atividade dessa enzima em maracujazeiro inoculado com *Xanthomonas campestris pv. passiflora* e tratados com extratos de *L. edodes* e *A. blazei*.

4.2.3 Avaliação da doença em casa vegetação

No ensaio em casa de vegetação foi observada diferença significativa entre os tratamentos para severidade de oídio (Figura 4.2). A Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) é um critério que representa a evolução da doença, considerando todas as avaliações conjuntamente e resumindo-as em um só valor. Houve proteção das plantas de soja submetidas aos tratamentos com FCM, os eliciadores diminuíram a infecção, reduzindo a severidade da doença.

A menor severidade (%) atingida pelos tratamentos pode ser observada quando se avalia a AACDP e se compara à testemunha. Os menores índices foram obtidos pelo tratamento com filtrado submetido a eliciação com AS e lignina, seguida pela aplicação do filtrado sem eliciação e do fungicida oxiclureto de cobre (0,5-1,5 L/ha). Tais resultados permitem afirmar que os FCM foram tão eficientes quanto o fungicida, não diferindo significativamente para o filtrado sem eliciação.

Esta redução na severidade da doença pode estar relacionada ao reconhecimento das moléculas de origem microbiana e ativação prévia de mecanismos de defesa da planta, através da resistência induzida, ou ainda por uma ação direta dos compostos sobre o fungo, resultado que foi confirmado no experimento *in vitro* para o filtrado submetido a eliciação com AS.

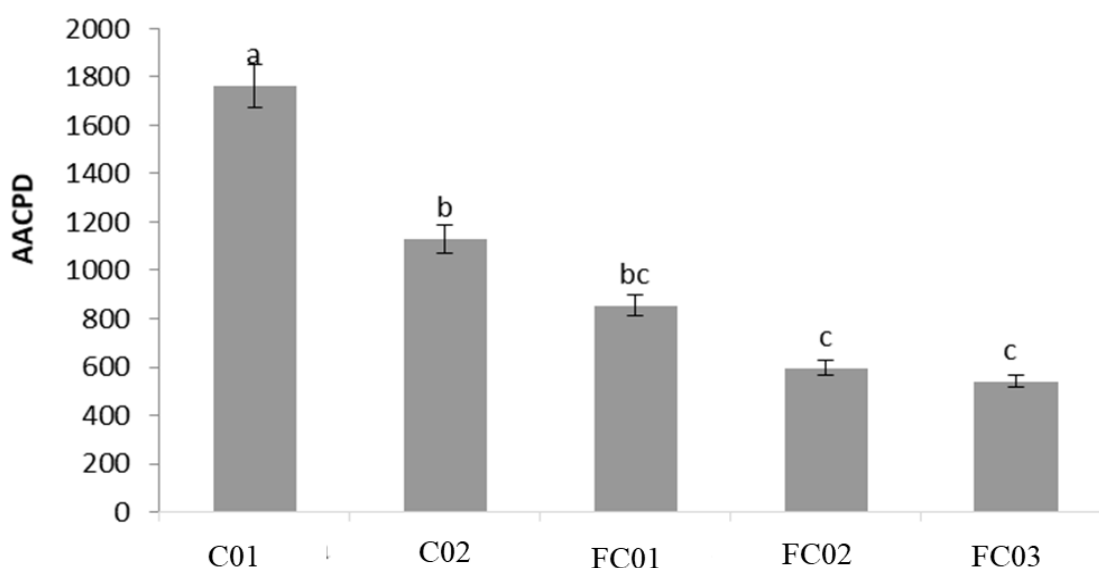


Figura 25- Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) causada por oídio da soja (*Erysiphe diffusa*). Plantas submetidas à aplicação de eliciadores, onde : C01- água destilada, C02- oxiclreto de cobre (0,5-1,5 L/ha), F01- filtrado do crescimento micelial de *G. lucidum* sem eliciação, FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos pelo teste Tukey significativo a 1% de probabilidade. Fonte: o autor (2019).

Os resultados obtidos por meio da análise de severidade condizem com o comportamento observado por meio das análises enzimáticas. A aplicação dos FCM de *G. lucidum* provoca uma resposta de defesa viável contra o oídio em plantas de *G. max*, podendo este comportamento estar associado à elevação das atividades de proteínas - enzima FAL, peroxidases, fenóis totais e quitinases poderiam estar atuando sobre a planta - ou ainda ao efeito direto na inibição do desenvolvimento do fungo. Esses resultados indicam que os compostos de *G. lucidum* são eficientes na redução da severidade de oídio em soja.

Pouquíssimas pesquisas relatam o grande potencial de compostos de *Ganoderma* no controle de doenças de plantas. Um composto chamado de G_app7 que foi isolado de *Ganoderma applanatum*, apresentou atividade anti-oomicótica semelhantes à estrobilurina. Esse composto foi eficiente na inibição do crescimento e desenvolvimento do míldio causada por *Sclerospora graminicola* em milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). O tratamento de sementes com G_app7 resultou em um aumento significativo na proteção contra doenças (63%) em condições de casa de vegetação, em comparação com o controle, que foi água (JOGAIAH et al.,

2016). O potencial dos extratos de basidiocarpos de *Ganoderma* sp. e *Oudemansiella canarii* na indução de resistência sistêmica em plantas de pepino contra o oídio (*Podosphaera xanthii*) também foram relatados nos trabalhos de Stadnik e Bettiol (2001, 2007).

O uso de elicitores é descrita na literatura como responsável pela redução na severidade de doenças em vários patossistemas. De Arruda et al. (2012) demonstraram que os extratos dos cogumelos *Agaricus blazei* (= *A. subrufescens*), *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* na concentração de 20% v/v também demonstraram efeito no controle de oídio em casa de vegetação. Em estudos realizados por Piccinin et al. (2010), houve redução de 34,53% em manchas foliares em sorgo (*Exserohilum turcicum* (Pass.) e *Colletotrichum sublineolum* Ces (Wils)), quando o extrato do basidiocarpo de *L. edodes* foi aplicado 48 horas antes da inoculação.

Na cultura do feijoeiro, Assi (2007) comprovou a redução de até 70% na severidade de *Colletotrichum lindemuthianum*, com a aplicação do extrato aquoso de *P. sanguineus* na concentração de 20% (v/v), não sendo, estatisticamente, diferente do tratamento com fungicida (axozystrobin 0,6 g.p.c/L). Di Piero (2003) constatou redução de 100% na incidência do *passion fruit woodiness vírus* (PWV) em plantas de maracujá pré-tratadas com o extrato aquoso de *Agaricus blazei* (= *A. subrufescens*). O autor também relatou que extratos de *Lentinula edodes* aplicados 5 dias antes da inoculação de maracujazeiros conferiram proteção local significativa contra PWV.

A busca por estratégias eficientes e sustentáveis no combate de patógenos de plantas é uma necessidade indispensável para agricultura. Com o crescente investimento no cultivo orgânico, onde não se aplica defensivos químicos para controlar doenças, estudos que demonstrem o potencial e eficiência de produtos naturais na redução da intensidade de doenças, são de relevante importância para o meio acadêmico e para o meio rural.

Os resultados deste trabalho mostram que os extratos de cogumelos têm potencial para serem utilizados no controle de doenças de plantas, seja pela atividade antimicrobiana direta ou pela ativação de mecanismos de resistência.

4.3 Toxicidade a organismos não-alvo

No estudo referente a ecotoxicologia, os FCM não apresentaram efeito tóxico para *Artemia salina*, pois não houve interferência na sobrevivência dos crustáceos em meio salino com a presença dos tratamentos. Na literatura pesquisada não foram encontrados relatos de testes de substâncias isoladas de *Ganoderma lucidum* com o bioensaio de *Artemia salina*.

Os testes de toxicidade são importantes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. A metodologia com o uso de *Artemia salina*, tem sido empregada para detectar toxicidade preliminar, realizar triagem de toxinas fúngicas, avaliar efeitos de exposição a metais pesados e pesticidas e para testes de toxicidade em materiais dentários (MARTINEZ et al., 1999; PELKA et al., 2000).

Para os testes da análise do desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus domesticus L*, os FCM de *Ganoderma* não demonstraram efeito nocivo ao desenvolvimento do embrião de *Gallus gallus domesticus L* na dosagem de 20 % v/v. Conforme a Figura 4.3, não houve diferença significativa para a taxa de viabilidade dos embriões expostos aos FCM, não diferindo do controle fechado e do controle com o meio BD.

A frequência cardíaca teve um decréscimo quando aplicados os filtrados de *Ganoderma* e *Ganoderma* + lignina. A FC média para o controle fechado e controle com BD se manteve na faixa de 160 batimentos por minuto (bpm); para os filtrados houve uma redução para 140 bpm, em média. Subsequentemente houve um retardo nos estágios do desenvolvimento dos embriões para os mesmos tratamentos.

Com relação aos estádios de desenvolvimento em que os embriões estavam, foi possível, com 72 horas de incubação, identificar cinco estádios embrionários diferentes (15,16,17,18,19 e 20), com predomínio de indivíduos nos estádios 17 e 18. Para o Filtrado apenas de *Ganoderma*, a média se manteve entre os estágios 16 e 17. O atraso no desenvolvimento embrionário pode ocorrer como uma das consequências da diminuição na renovação de oxigênio nas células. Isso não significa necessariamente um efeito nocivo ao seu desenvolvimento total. Também não foram observadas anormalidades no desenvolvimento dos embriões.

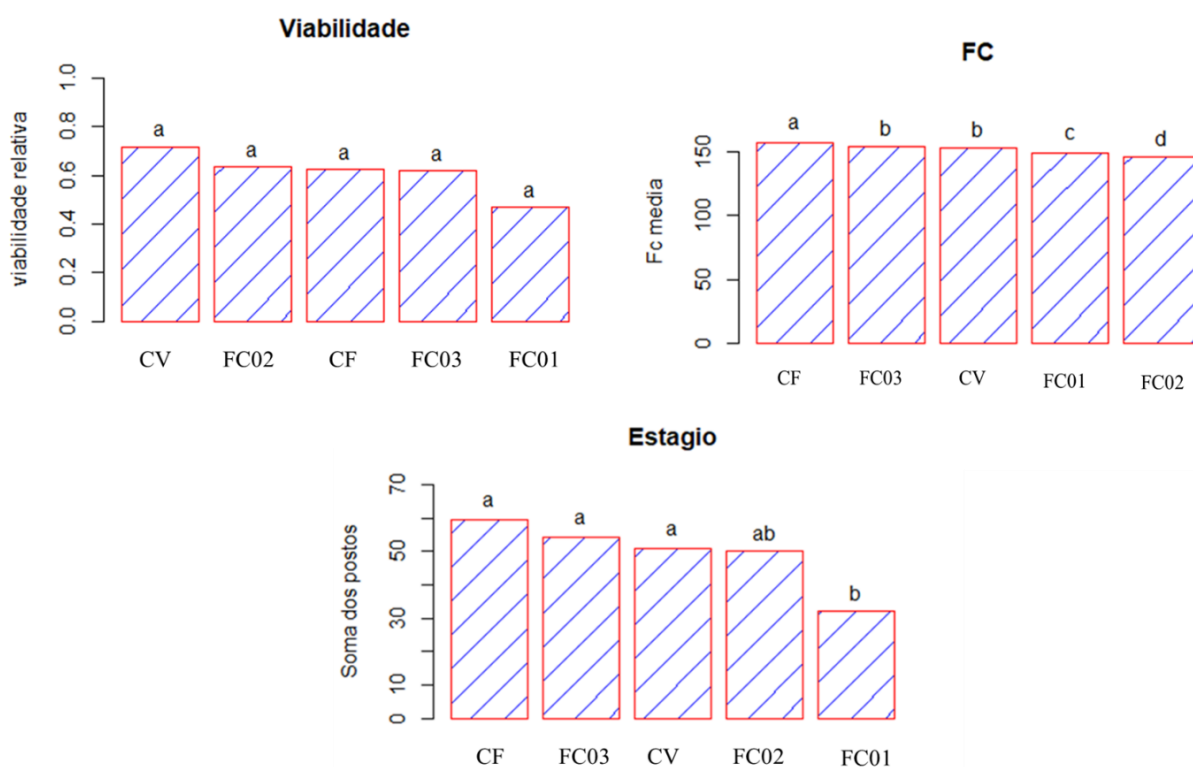


Figura 26-Viabilidade dos embriões, Frêquência cardíaca e estágios do desenvolvimento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. tratados com os FCM, onde: CF- controle fechado, CV- controle com meio BD; FC01- filtrado do crescimento micelial de *G.lucidum* sem eliciação; FC02- filtrado da eliciação com lignina, FC03- filtrado da eliciação com AS. Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos. Fonte: o autor (2019).

A utilização de embriões de galinha como modelo de estudo para testes toxicológicos é uma abordagem de fácil execução, rápida e prática, já que é possível acompanhar o desenvolvimento embrionário e monitorar alterações.

Não há registro de toxicidade em trabalhos realizados por outros pesquisadores. Atoji-Henrique (2015) em trabalho realizado com a mesma cepa deste trabalho, de *Ganoderma lucidum*, demonstrou que o fornecimento de micélio incluído na ração, em diferentes níveis (0,5%, 1,0% e 1,5%), para coelhos, não interferiu no comportamento ingestivo, nos parâmetros de desempenho e de avaliação de carcaça dos animais. O nível 0,5% favoreceu os segmentos do intestino relacionados com a absorção de nutrientes. Nascimento et al. (2015) realizaram ensaio de toxicidade aguda em camundongos Swiss adultos e sadios (machos e fêmeas), administrando dose de 1mL/Kg do extrato hidroetanólico do *Ganoderma lucidum*. Este extrato hidroetanólico não apresentou toxicidade significativa, de acordo com os dados estatísticos.

Na *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2000), o cogumelo *G.*

lucidum, após 30 anos de estudos farmacológicos, está listado como não tóxico e com efeito modulador do sistema imunológico em humanos (CHANG, 1986; LIN; ZB, 2001).

Muitos estudos comprovam diferentes atividades medicinais deste cogumelo: Gao et al. (2002) demonstraram o efeito benéfico produzido por polissacarídeos de *G. lucidum* em ratos com úlcera gástrica. Segundo Lee et al. (2003), o extrato aquoso de *G. lucidum*, administrado intraperitonealmente ou oralmente, resultou em significativo incremento na sobrevivência de camundongos implantados com diferentes tumores. Chung et al. (2001) demonstraram que polissacarídeos, extraídos do caldo de cultivo micelial de *G. lucidum* inibiram o desenvolvimento de várias linhagens tumorais *in vitro*.

5. CONCLUSÃO

Os filtrados do crescimento micelial de *G. lucidum* têm potencial para serem utilizados no controle de doenças de oídio na cultura da soja, seja pela atividade antimicrobiana direta ou pela ativação de mecanismos de resistência.

Os filtrados de *Ganoderma* associados com AS apresentam ação fungicida sobre o oídio (*Erysiphe diffusa*) *in vitro*, sendo a concentração inibitória mínima de 50 mg. mL⁻¹.

Os filtrados de *Ganoderma* demonstraram potencial de indução de resistência em plantas de soja, pela ativação de fitoalexinas, ativação da enzima fenilalanina amônia-liase, incremento de compostos fenólicos, atividade de peroxidases e da enzima quitinase, sendo que tais efeitos possuem especificidade com relação ao tempo de ativação e associação com eliciadores.

Os FCM possuem potencial fungicida quando aplicados em plantas de soja infectadas por oídio, reduzindo a severidade da doença.

Os FCM demonstraram ser atóxicos aos organismos não-alvo testados.

Novos trabalhos devem ser considerados, buscando identificar e isolar os princípios ativos presentes nos FCM, bem como em outros patossistemas de interesse agrícola.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, James. E.; GILBERTSON, Robert. L.; BLANCHETTE, Robert. A. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1932-1943, 1990.

AGRIOS, George N. Introduction to plant pathology. **Elsevier Academic Press Publication**, 2005.

AGUIAR, Tarsis de et al. **Frações polissacarídicas de fungos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) na indução de resistência em tomateiro (*Solanum lycopersicon*) contra *Xanthomonas gardneri***. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2016.

ALEXOPOULOS, Constantine John.;Mims, C.W. **Introductory mycology**. New York: John Wiley & Sons. 1979. 632p.

ALMEIDA, Hebréia Oliveira et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2012.

ARRUDA, Rafael Sanches ; MESQUINI, Renato Moreschi.; SCHWAN-ESTRADA, Katia Regina Freitas.; NASCIMENTO, Jefferson Fernandes. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 164-172, 2012

ATOJI-HENRIQUE, Katia. **Crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* em diferentes substratos e relação com concentração de β -glucanas, atividade antioxidante e efeitos sobre o desempenho de coelhos.** Tese Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 110p, 2015.

AYO, R. G.; AMUPITAN, J. O.; ZHAO, Yimin. Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1, 6, 8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, 2007.

BABY, Sabulal; JOHNSON, Anil John; GOVINDAN, Balaji. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 66-101, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>

BAI, Dan et al. Antiplastic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Agric. Boreali Sin**, v. 23, p. 282-285, 2008.

BALASUBRAMANIAN, Vaiyapuri et al. Plant β -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 11, p. 1983-1990, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>

BAO, Xingfeng et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydrate research**, v. 332, n. 1, p. 67-74, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00075-1)

BAO, Xing-Feng; WANG, Xue-Song; DONG, Qun et al. Structural Features of Immunologically Active Polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v.59, p.175-181, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00450-2)

BEDENDO, I.P. et al. n: AMORIM, Lilian.; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIM FILHO, Armando. (Ed.). Manual de Fitopatologia Princípios e Conceitos Volume I. 4.ed. Piracicaba Agronomia Ceres, 2011. p.473-477

BENINCA, Camila Peiter. **Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidase em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.** 2007. 45f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

BENUZZI, Massimo.; BALDONI, G. AQ10-a new biofungicide based on *Ampelomyces quisqualis* for powdery mildew control on grapes [*Vitis vinifera* L.]. **Informatore Fitopatologico (Italy)**, 2000.

BEROVIČ, Marin et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 77-86, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00069-5)

BETTIO, Wagner.; GHINI, Raquel.; MORANDI, Marcelo .A.B.; STADNIK, Marciel .J.; KRAUS, Urike.; STEFANOVA, Marusia. & PRADO, Alba.M.C. Controle biológico de doenças em plantas na América Latina. In: Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**. 2008.pp. 303-331.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BLOOMBERG BUSINESS. **L'Oreal eats into P&G's China lead with mushroom lotions.** Disponível em: <<http://www.bloomberg.com/news/articles/20130321/loreal-eats-into-pgs-china-lead-with-mushroom-lotions>> Acesso em: 18/10/2018.

BLUM, LUIZ et al. Fungicidas e mistura de fungicidas no controle do oídio da soja. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 2, p. 316-318, 2002.

BOH, Bojana et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. **Biotechnology annual review**, v. 13, p. 265-301, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6)

BOLLER, T. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 189–214, 1995.

BOLLER, Thomas; FELIX, Georg. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

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**, v.72, n.1-2, p. 248–254, 1976.

BRAUN, U., TAKAMATSU, S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, v.4, p.1-33, August, 2000.

CAO, Peng-Fei et al. Effects of exogenous salicylic acid on ganoderic acid biosynthesis and the expression of key genes in the ganoderic acid biosynthesis pathway in the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 1 pg 65-73, 2017. DOI: 10.1615 / IntJMedMushrooms.v19.i1.70

CARNEIRO, Solange. M. de T. P. G.; PIGNONI, Erika.; VASCONCELLOS, Maria. E. da C.; GOMES, José. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34- 39, 2007.

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-

CHANG, Shu-Ting; BUSWELL, John A. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae)-A Mushrooming Medicinal Mushroom. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, n. 2, p. 139–146, 1999.

CHENG, Chun-Ru et al. Preparative isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by counter-current chromatography combined with pH-zone-refining. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1010-1016, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.122>

CHISHOLM, Stephen T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>

CHOI, Hyong Woo; KLESSIG, Daniel F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 232, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>

CHUNG, Woo Teak et al. Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 550-555, 2001.

CILERDZIC, Jasmina; STAJIC, Mirjana; VUKOJEVIC, Jelena. Potential of submergedly cultivated mycelia of *Ganoderma* spp. as antioxidant and antimicrobial agents. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 275-282, 2016.

CLSI -**Clinical and Laboratory Standards Institute - reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard**, 3ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, (CLSI document M27-A3).

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.v.12, safra 2017/2018, décimo segundo levantamento**. Brasília: CONAB, 2018. 148p.

CONRATH, Uwe et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>

COQUEIRO, Danila Souza Oliveira; MARASCHIN, Marcelo; PIERO, Robson Marcelo Di. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7-8, p. 488-494, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01791.x>

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006

DAI, Yu-Cheng et al. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 11, n. 3, 2009.

DANGL, Jeffery L.; HORVATH, Diana M.; STASKAWICZ, Brian J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 746-751, 2013.

DE ALMEIDA, Rodrigo; FORCELINI, Carlos Alberto; FIALLOS, Felipe Rafael Garcés. Chemical control of foliar diseases in soybean depends on cultivar and sowing date. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v33n5a2017-36931>

DE WIT, Pierre JGM. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007. DOI 10.1007/s00018-007-7284-7

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. 157f. Tese. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil. 2003.

DI PIERO, Robson M.; WULFF, Nelson A.; PASCHOLATI, Sérgio F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 175-180, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000200015>

DI PIERO, Robson Marcelo; NOVAES, Quelmo Silva de; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Lentinula edodes* mushrooms on the infection of passionflower with Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 269-278, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200004>

DI PIERO, Robson. M.; PASCHOLATI, Sergio. F.; REZENDE, J. A. M. Efeito das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. na infectividade do vírus do mosaico do fumo (TMV). **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p.215-220, 2000.

DJAMEI, Armin et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 395, 2011.

DOEHLEMANN, Gunther et al. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. **The Plant Journal**, v. 56, n. 2, p. 181-195, 2008.

FANG, Qing-Hua; ZHONG, Jian-Jiang. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9)

FAUTH, Markus et al. Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. **Plant Physiology**, v. 110, n. 2, p. 347-354, 1996.

FERREIRA, Isabel CFR et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. **Phytochemistry**, v. 114, p. 38-55, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.011>

FIORI-TUTIDA, A. C. G. **Uso de extratos de cogumelos comestíveis e medicinais no controle da ferrugem da folha e helmintosporiose em trigo**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

GAO, Y.; ZHOU, S.; WEN, J.; HUANG, M.; XU, A. Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. **Life Sci.**, v. 72, p. 731-745, 2002.

GARCIA, C. **Óleo vegetal no controle do míldio e suspensão miceliada aquosa de *Agaricus brasiliensis* na indução de resistência de videiras cv. Isabel Precoce**. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 93p. Dissertação. Pós-Graduação em Agronomia, Guarapuava, 2014.

GETHA, K.; HATSU, M.; WONG, H.J.; LEE, S.S. Submerged cultivation of basidiomycete fungi associated with root diseases for production of valuable bioactive metabolites. **J. Trop. Forest Science**. v. 21(1), p. 1-7, 2009.

GLAZEBROOK, Jane. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 205-227, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>

GÖHRE, Vera; ROBATZEK, Silke. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 46, p. 189-215, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050>

GÓMEZ-GÓMEZ, Lourdes. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. **Molecular immunology**, v. 41, n. 11, p. 1055-1062, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.008>

GOW, Neil A.; GADD, Geoffrey M. (Ed.). **Growing fungus**. Springer Science & Business Media, 2007.

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

GRAHAM, Terrence Lee. Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In: **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. Routledge, 2017. p. 85-116.

GRAU, C. R. Observations on resistance and heritability of resistance to powdery mildew of soybean. **Plant Dis Rep**, v. 59, p. 458-460, 1975.

GREEN, N. E.; HADWIGER, L. A.; GRAHAM, S. O. Phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis f. sp. tritici* [Powdery mildew, fungus]. **Phytopathology (USA)**, 1975.

GRIGOLLI, J.F.J. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Aracaju, p.205-231, Abril, 2014.

GU, Li et al. *Ganoderma lucidum* triterpenoid production: elicitation and signal transduction strategy. **Process Biochemistry**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.019>

GURUNG, O. K.; BUDATHOKI, U.; PARAJULI, G. Effect of different substrates on the production of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) Karst. **Our Nature**, v. 10, n. 1, p. 191–198, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3126/on.v10i1.7781>

GUST, Andrea A.; PRUITT, Rory; NÜRNBERGER, Thorsten. Sensing danger: key to activating plant immunity. **Trends in plant science**, v. 22, n. 9, p. 779-791, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>

GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, M. J.; ALMENDROS, G.; GONZÁLES-VILA, F. J.; MARTÍNEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **Sci. Total Environ.**, v. 167 p. 315-328, 1995.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, n.9/10, p.449-454, 1996

GUZZO, Sylvia Dias. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Tese (Doutorado em de Energia Nuclear na Agricultura)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 236 pp 2004.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, CA, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAHN, Matthias; MENDGEN, Kurt. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 4, p. 322-327, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00180-1)

HAMBURGER, Viktor; HAMILTON, Howard L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HARMAN, Gary E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>.

HAWKSWORTH, D. L.; Mushrooms: the extent of the unexplored potential. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 4, 2001, DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v3.i4.50.

HELENO, Sandrina A. et al. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and chemical toxicology**, v. 58, p. 95-100, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.025>

HRAZDINA, Geza. Compartmentation in aromatic metabolism. In: **Phenolic metabolism in plants**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 1-23.

HUANG, Hung-Chang et al. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 32, n. 2, p. 217-224, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0239-z>

HUIE, Carmen W.; DI, Xin. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 241-257, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.038>

IGARASHI, S. et al. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Instituto Biológico de São Paulo**, v. 77, n. 2, p. 245-250, 2010.

JOGAIAH, Sudisha et al. Enhancement of downy mildew disease resistance in pearl millet by the G_app7 bioactive compound produced by *Ganoderma applanatum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 109-117, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.006>

JONES, Jonathan ;DANGL, Jeffery. The plant immune system. **Nature Reviews**, v.444, (novembro), p.323–329, 2006.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature05286>

KAMBLE, Reshma.; VENKATA, Satish; GUPTE, Arpita. M. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* mycelia. **J. Pure Appl. Microbiol**, v. 5, p. 983-986, 2011.

KAMRA, Anita; BHATT, A. B. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 4, n. 2, p. 359-362, 2012.

KANAGAWA, Amélia laeca, NEVES, Maria Alice. **Biologia e sistemática de fungos, algas e briófitas – Unidade 1: Fungos**. In: Guerra, Rafael Angel Torquemada (Org.) Cadernos Cb Virtual 2. João Pessoa: Ed. Universitária, 2011. P.258-277.

KANWAR, Anubha Singh. Brine shrimp (*Artemia salina*) a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, 2007.

KEYPOUR, Somayeh et al. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllophoromycetideae), from Iran. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 10, n. 4, 2008.

KIM, S.H.; OLSON, T.N.; PEFFER, N.D.; NIKOLAEVA, E.V.; PARK, S.; KANG, S. First report of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas gardneri* in Pennsylvania. **Plant Disease**, v.94, n.5,p.638-638, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0638B>

KLESSIG, Daniel F.; MALAMY, Jocelyn. The salicylic acid signal in plants. **Plant molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 1439-1458, 1994.

KLOSOWSKI, Ana C. et al. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest management science**, v. 72, n. 6, p. 1211-1215, 2016.

KOBORI, Nilce N. *et al.* Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal biology**, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 365-377, 1995.

KUHN, Odair José. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KUNOH, H. Primary germ tubes of *Erysiphe graminis* conidia. **Plant infection: the physiological and biochemical basis/edited by Yasuji Asada...[et al.]**, 1982.

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*)**. 2002. 107f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LEE, Hwanyoung; SONG, Minkyung; HWANG, Seokhwan. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1685-1693, 2003.

LEE, Hwanyoung; SONG, Minkyung; YU, Youngseob et al. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 93-99, 2003.

LEE, Kyu Min; LEE, Shin Young; LEE, Hyeon Yong. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 646-650, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87094-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87094-2)

LIN, Zhi-Bin Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. **Pharmacology Science**, v. 99, p.144-153, 2005.

LINDEQUIST, Ulrike; JÜLICH, Wolf-Dieter; WITT, Sabine. *Ganoderma pfeifferi*—a European relative of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 102-108, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.018>

LIU, Rui et al. SA inhibits complex III activity to generate reactive oxygen species and thereby induces GA overproduction in *Ganoderma lucidum*. **Redox biology**, v. 16, p. 388-400, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.018>

LU, HUIMEI et al. Prevention of development of N, N'-dimethylhydrazine-induced colon tumors by a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in male ICR mice. **International journal of molecular medicine**, v. 9, n. 2, p. 113-117, 2002. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.9.2.113>

LUIZ, C.; FELIPINI, R.B.; COSTA, M.E.B.; DI PIERO, R.M., 2012. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 387–393, 2012. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.046>

LUIZ, C.; ROCHA NETO, A.C.; DI PIERO, R.M. Induced resistance in tomato leaves against *Xanthomonas gardneri* by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, p.119-127, 2015. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.029>

MAHENDRAN, S. et al. Antibacterial potential of microbial exopolysaccharide from *Ganoderma lucidum* and *Lysinibacillus fusiformis*. **Int. J. Recent Sci. Res**, v. 4, p. 501-505, 2013.

MANDAL S., DAS R.K., MISHRA S. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.117-123, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.10.006>

MATSUNO, Hiroshi; URITANI, Ikuzo. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja**. 2003. Dissertação (Mestrado)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003

MEINERZ, C. C. et al. Potencial indutor de resistência em soja do extrato aquosos de *P. sanguineus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 304, p. 557-582, 2007.

MENDGEN, Kurt; HAHN, Matthias. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in plant science**, v. 7, n. 8, p. 352-356, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02297-5)

MIGNUCCI, J. S; BOYER, J. S. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa*. **Phytopathology**, v. 69, n. 3, p. 227-230, 1979. DOI: 10.1094 / Phyto-69-227

MILES Philip G.; CHANG Shu-Ting. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact**. 2ed. Londres: CRC Press, 480p. 2004.

MIZUNO, Takashi et al. Reishi, *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma tsugae*: substâncias bioativas e efeitos medicinais. **Food Reviews International**, v. 11, n. 1, p. 151-166, 1995.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MOORE-LANDECKER, Elizabeth et al. Fundamentals of the fungi. **Fundamentals of the fungi**., 2ª Edn. Prentice-Hall, Nova Jersey.1972.

MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M.J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. **Summa Phytopathologica**, v. 2, p. 39-43, 1976.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biol Rev** 26: 73–83. 2012.

MOTHANA, R.A.A. et al. Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hidroquinones from basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 116-118, 2000.DOI: 10.1021 / np990381y

MURTHY, Hosakatte Niranjana; LEE, Eun-Jung; PAEK, Kee-Yoeup. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014

NASCIMENTO, P. A. M., OKAMOTO, M. K. H., BACH, E. E., WADT, N. S. Y. Avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico do fungo *Ganoderma lucidum*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy browser genus *Ganoderma***. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5314>> Acesso em 20 de outubro de 2018.

OSIŃSKA-JAROSZUK, Monika et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1823-1844, 2015.DOI: 10.1007/s11274-015-1937-8

PARADA R.Y., MURAKAMI S., SHIMOMURA N., EGUSA M., OTANI H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Phytopathology**, v.160, p.390-396, 2012.DOI: <http://doi.org/10.1111/J.1439-0434.2012.01916.X>

PARK, Jong Pil et al. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1257-1262, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00005-5)

PASCHOLATI, Sergio Florentino.; BLUMER, Silvia.; REZENDE, Dalila Carvalho.; BRAND, Simone Cristina. Indução De Resistência Novos Conceitos e Aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas**. Lavras, MG, 2010.

PATEL, Heena; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in plant tissue culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, 2013.

PATERSON, Russell M. Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18,p.1985-2001, 2006.

PAZUCH, Daiane. 2007. **Potencial Indutor de Fitoalexinas do Filtrado de Cultura e Extrato de Basidiocarpos e de Micélio de *Pycnoporus sanguineus* em Sorgo e Soja**. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Candido Rondon.

PELKA, Mathias, et al. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of dentistry**, v. 28, n. 5, p. 341-345, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(00\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(00)00007-5)

PÉREZ-VEGA, Elena et al. Genetic mapping of two genes conferring resistance to powdery mildew in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and applied genetics**, v. 126, n. 6, p. 1503-1512, 2013.

PETERSEN, Jens H. **Ganoderma lucidum**. [1982?]. Disponível em: <http://www.mycobase.org/result_textsearch.shtml?genSpec=Species&ID=762&showList=DropDown&random=9830> Acesso em 12 out 2018.

PETRE, Marian; PETRE, Violeta. **Environmental biotechnology for bioconversion of agricultural and forestry wastes into nutritive biomass**. In: PETRE, Marian (Ed.) *Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications*. Croácia Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-biotechnology-new-approaches-and-prospective-applications/environmental-biotechnology-for-bioconversion-of-agricultural-and-forestry-wastes-into-nutritive-bio>>. Acesso em: 22 out. 2018.

PICCININ, Everaldo. **Cultivo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em toras de eucalipto: teoria e prática**. ESALQ, Divisão de Biblioteca e Documentação, 2000.

PICCININ, Everaldo; DI PIERO, Robson M.; PASCHOLATI, Sérgio F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582005000100001>

PICCININ, Everaldo; DI PIERO, Robson Marcelo; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. "shiitake" (*Lentinula edodes*) mushroom reduces growth of plant pathogens and leaf spot severity in sorghum. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 68-72, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052010000100012>

PUNJA, Zamir K.; UTKHEDE, Raj S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)

RIVERO, Lilianna Biachini Dallanhol, *et al.* Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*. Florianópolis, SC. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 1, n.1, p 83-87, 2006.

ROBERTS, Stephen M.; JAMES, Robert C.; WILLIAMS, Phillip L. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. John Wiley & Sons, 2014.

RODRIGUES, Edvirgem., SCHWAN-ESTRADA, Katia Regina Freitas., FIORITUTIDA, Ana Cristina G., STANGARLIN, Jose Renato , CRUZ, Maria Eugenia. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa phytopathologica**, v. 33, n. 2 p. 124-128, 2007.

ROMEIRO, Reginaldo da Silva . **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

RUBEL, Rosália. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**, 2006. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 98-102, 2005.

SAJEENA, A; MARIMUTHU, Thambiayya Efficacy, stability and persistence of Ganosol, a *Ganoderma* based fungicide against plant pathogens. **The Journal of Plant Protection Sciences**, v. 5, n. 1, p. 17-25, 2013.

SÁNCHEZ-BAIN, Andrés et al. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. CIID, Ottawa, ON, CA, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, Kátia Regina Freitas et al. Extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas. *Hortic. bras.*, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009

SEO, G. S.; KIRK, P. M. ***Ganoderma*: nomenclature and classification**. In: *Ganoderma* diseases of perennial crops. FLOOD, J.; HOLDERNESS, .M. UK, Royal Garden Academy: CABI Bioscience, 2000. Acesso: 10 outubro. 2018.

SHAHID, Ahmad Ali et al. Antifungal Potential of *Ganoderma lucidum* Extract Against Plant Pathogenic Fungi of Calendula Officinalis L. In: **5 th International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences. March**. 2016. p. 24-25.

SHANER, Gregory; FINNEY, Robert. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SHETTY, Nandini P. et al. Effects of β -1, 3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4287-4300, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp269>

SHI, Liang, REN, A., MU, D. e ZHAO, M. Progresso atual no estudo da biossíntese e regulação dos ácidos ganoderídeos. **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, v. 88, n. 6, p. 1243-1251, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2871-1>

SILVA, Ricardo F.; PASCHOLATI, Sérgio F.; BEDENDO, Ivan. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 3, p. 189-196. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000300002>

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (*Solanaceae*) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 419-425, 2005.

SKALICKA-WOZNIAK, Krystyna et al. Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, n. 1, 2012.

SMANIA, Elza de Fatima, et al. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 375-377, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00064-9)

SMITH, Cajuan J. Tansley Review No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New phytologist**, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>

SRIRAM, Subbaraman; ROOPA, Kodigehalli Panchakshari; SAVITHA, Maheshwarappa Jeyamma. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1334-1339, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.06.003>

STADNIK, Marciel. J. **História e taxonomia de oídios**. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. Oídios. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

STADNIK, Marciel.J.; BETTIOL, Wagner. Controle biológico de oídios. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Controle Biológico, Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000. v. 2, p. 95-116

STANGARLIN, Jose Renato.; KUHN, Odair Jose.; TOLEDO, Marcia Vargas.; PORTZ, Tatiane Martinazzo.; SCHWAN-ESTRADA, Katia Regina Freitas.; PASCHOLATI, Sergio Florentino. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. cap.10, p.387-416.

TAIZ, Lincoln.; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2017.

TAKAHASHI, Jacqueline A.; LUCAS, Esther MF. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700036>.

TANG, Ya-Jie; ZHONG, Jian-Jiang. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1-2, p. 20-28, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00066-2)

TANG, Ya-Jie; ZHONG, Jian-Jiang. Scale-Up of a Liquid Static Culture Process for Hyperproduction of Ganoderic Acid by the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 6, p. 1842-1846, 2003.

TOL – Tree Of Life web Project – Fungi – **Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.** Disponível em <<http://tolweb.org/Fungi/2377>> Acesso em 10 de outubro de 2018.

TONUCCI, Nivea Maria . **Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e Tobacco mosaic vírus (TMV)**. Piracicaba, 2004. 87 p. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

URBEN, Arailde Fontes. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília Embrapa, 151p, 2017.

URBEN, Arailde Fontes. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Desenvolvimento**, 2004.

VAN DER HEM, Lieuwe G. et al. Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. **Transplantation**. n. 60, v. 5:438-43. 1995.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>

VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN 'T WESTENDE, Y.A.M.; HARTOG, F.; VAN LOON, L.C. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.716-724, 1997. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.6.716>

VARÓ, I. et al. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 563-569, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00075-9)

VIECELLI, Clair Aparecida et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

VIECELLI, Clair Aparecida et al. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 87-96, 2009.

WAGNER, Ricardo et al. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. **Food technology and biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 371-382, 2003. DOI: [orcid.org/0000-0001-9355-5520](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.013)

WAGNER, Ricardo et al. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. **Journal of biotechnology**, v. 114, n. 1-2, p. 153-164, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.013>

WALTERS, Dale R.; RATSEP, Jaan; HAVIS, Neil D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>

WAN, Wan Abd Al Qadr Imad et al. The morphology of *Ganoderma lucidum* mycelium in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 2-11, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.05.005>

WANG, Hexiang; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 27-30, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.009>

WASSER, Solomon. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical journal**, v. 37, n. 6, p. 345–56, 2014.

WASSER, Solomon. P.; WEIS, Alexander . L. General description of the most important medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 351–370, 1999. DOI:10.1615 / IntJMedMushr.v1.i4.80

WHIPPS, John M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 1997. p. 1-134. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60119-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60119-6)

WIRTH, Stephan; WOLF, Gerhard. Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p.511-519, 1992

WOLPERT. Lewis. *et al.* **Princípios de Biologia do Desenvolvimento.**: 1ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.

XU, Yi-Ning; XIA, Xiao-Xia; ZHONG, Jian-Jiang. Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn²⁺ in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 11, p. 2358-2365, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.25288>

XU, Yi-Ning; ZHONG, Jian-Jiang. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1301-1308, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.001>

YANG, Fan-Chiang; KE, Yn-Fuu; KUO, Shanq-Shin. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 3-5, p. 295-301, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00213-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00213-1)

YANG, Fan-Chiang; LIAU, Chun-Bun. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00023-5)

YANG, Fan-Chiang; YANG, Mine-Je; CHENG, Shueh Hen. A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 2, p. 148-154, 2009. DOI: 10.1016/j.jtice.2008.09.003

YOHALEM D.S., NORDHEIM E.V., ANDREWS J.H. The effect of water extracts of spent mushroom compost on apple scab in the field. **Phytopathology**, v.86, p.914-922, 1996.

YORINORI, J. T. . Cultivares de soja resistentes a *Microsphaera diffusa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 320-321, 1997.

YORINORI, J. T.; SARTORATO, A. **Oídios e leguminosas: feijão e soja**. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Org.). Oídios. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 255-284, 2001.

YOU, Bang-Jau et al. A novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53616, 2013

YU, Guo-Jun et al. Deep insight into the *Ganoderma lucidum* by comprehensive analysis of its transcriptome. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e44031, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044031>

YUEN, John WM; GOHEL, Mayur Danny I. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. **Nutrition and cancer**, v. 53, n. 1, p. 11-17, 2005. DOI: https://doi.org/10.1207/s15327914nc5301_2

ZHANG, Jinming; ZHONG, Jian-Jiang; GENG, Anli. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1580-1586, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.018>

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharide from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Food Sci. and Technol.**, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZHANG, Wei; TANG, Ya-Jie. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 6, p. 1249-1261, 2008. DOI: 10.1002 / btpr.36

ZHOU, Xuanwei; LIN, Juan; YIN, Yizhou et al. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, n. 4, p. 559-574, 2007.

ZHOU, Yan et al. Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 673-680, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.12.011>

ZHU, Li Wen ; ZHONG, Jian Jiang; TANG, Ya-Jie. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1359-1370, 2008.

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, n. 3 p. 321-331. 1982.

ZIPFEL, Cyril, et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 749-760, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>

ZONG, Aizhen; CAO, Hongzhi; WANG, Fengshan. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate polymers**, . 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026>

7. ANEXOS

ANEXO 1: TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL – EMBRAPA/UTFPR

ANEXO 2: PARECER DE APROVAÇÃO NO CEUA – UTFPR



12

ISSN 1677-7069

Diário Oficial da União - Seção 3

Nº 245, quarta-feira, 18 de dezembro de 2013

13/12/2013. DERCINO FERNANDES DOS SANTOS, Chefia Adjunto Administrativo. Ratificação em 13/12/2013. JOSE ROBERTO RODRIGUES PERES, Chefe Geral da Embrapa Cerrados. Valor Global: R\$ 5.080,00. CNPJ CONTRATADA - 33.285.365/0001-00 SINC DO BRASIL INSTRUMENTAÇÃO CIENTÍFICA LTDA.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135039-13203-2013NE000071

EMBRAPA GADO DE LEITE

RESULTADOS DE JULGAMENTOS
PREGÃO ELETRÔNICO Nº 78/2013

A Embrapa Gado de Leite comunica o resultado de julgamento do Pregão Eletrônico nº 78/2013 (aquisição de alimento para bovino leiteiro). Empresas vencedoras: Master Alimentos Ltda. (itens 3 e 10 - R\$ 38.212,00); Produxim Tecnologia em Nutrição Animal Ltda. - EPP (itens 5, 6 e 8 - R\$ 51.447,75); Sandra Alves Moreira - ME (item 1 - R\$ 131.979,05); Vetbrasil Agroveterinária Ltda. (item 9 - R\$ 999,00); Manaim Comercial Ltda. - ME (item 11 - R\$ 12.000,00); Comercial Coimbreense Ltda. - ME (itens 2 e 4 - R\$ 6.243,98); Alexandre H.M. Chamone Comércio - EPP (item 7 - R\$ 22.484,32).

PREGÃO ELETRÔNICO Nº 80/2013

A Embrapa Gado de Leite comunica o resultado de julgamento do Pregão Eletrônico nº 80/2013 (aquisição de medicamento veterinário). Empresas vencedoras: Veterinária Sul Catarinense Ltda. ME (itens 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 15, 16, 26, 29, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 - R\$ 30.121,27); E.R. Félix Prod. Agrup. ME (itens 9, 14, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 28, 32, 42 - R\$ 3.720,52); Vetbrasil Agroveterinária Ltda. - ME - itens 1, 23, 25, 27 - R\$ 21.191,96)

RÓSILÉIA DELGADO
Pregoeira

EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA

EXTRATO DE CONTRATO

Espécie: Contrato; Partes: Embrapa SCT CNPJ/MF 00.348.003/0129-84 e a Livraria e Distribuidora - Mentis - Sama Eireli; CNPJ: 03.549.389/0001-17; Objeto: Estabelecer condições básicas para remessa em consignação, pela Embrapa, de publicações impressas e eletrônicas (livros, revistas, DVD e CD-Rom) de sua edição ou coedição, cujo conteúdo trata de temas relacionados à pesquisa agropecuária para que esta se venda em seu(s) estabelecimento(s) comercial(is) ou em eventos que a Embrapa considere oportuno participar ou ainda em estabelecimento de licitação. Modalidade de Licitação: Não Aplicável; Fonte de Recursos: Não Aplicável; Valor Global: Não Aplicável; Data de Assinatura: 06/11/2013; Vigência: 60 meses; Signatários: Pela Embrapa, Dra. Selma Lúcia Lira Beltrão, Gerente Geral Interna e pela Livraria e Distribuidora Mentis Sama Eireli, Alexandre Pedro dos Reis.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL

EXTRATO DE REGISTRO DE PREÇOS

Espécie: Ata de Registro de Preço nº 133/2013 da Embrapa/Cnmpf, decorrente do Pregão Eletrônico nº 52/2013. Fornecedor Beneficiário: QUALICOPY GRÁFICA E EDITORA LTDA - ME - CNPJ: 10.427.760/0001-33. Objeto: Registro de preço para prestação de serviços gráficos para a Embrapa/CNPMF. Itens registrados: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23. Valor global registrado: R\$ 46.700,00. Data de assinatura: 10/12/2013. Vigência: 10/12/2013 a 10/12/2014. Signatários: Marcelo do Amaral Santana/CNPMF e Fabio Dias dos Santos, pelo Fornecedor Beneficiário.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE

EXTRATO DE INEXIGIBILIDADE DE LICITAÇÃO
Nº 22/2013 - UASG 135025

Nº Processo: 159/2013. Objeto: Contratação de serviço de suporte para o software SimaPRO Analyst por 12 (doze) meses. Total de Itens Licitados: 00001. Fundamento Legal: Art. 25º, Caput da Lei nº 8.666 de 21/06/1993. Justificativa: Contratação através de inexigibilidade visto tratar-se de serviço prestado de forma exclusiva no Brasil. Declaração de inexigibilidade em 04/12/2013. MARCOS ANTONIO VIEIRA LIGO, Chefe Adjunto de Administração. Ratificação em 17/12/2013. CELSO VAINER MANZATTO, Chefe Adjunto de Administração. Valor Global: R\$ 7.460,00. CNPJ CONTRATADA: 17.686.302/0001-68 ACV BRASIL LICENCIAMENTO DE SOFTWARES E TREINAMENTOS LTD - ME.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135025-13203-2013NE999999

EMBRAPA MEIO-NORTE

EXTRATO DE CONTRATO

Espécie: Contrato Múltiplo de Prestação de Serviços de Venda de Produtos; Partes: Embrapa Meio-Norte, CNPJ 00.348.003/0133-60 (Contratante), e a Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos - Diretoria Regional do Piauí (Contratada), CNPJ/MF nº 34.028.316/0002-38; Objeto: Incluir o Serviço de Correio Internacional no Contrato de Prestação de Serviços e Produtos, Modalidade de Licitação: Não se aplica; Fonte de Recurso: 0100 Valor Global:

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00032013121800012

Não alterado; Vigência: 28/11/2013 a 16/10/2014; Data da Assinatura: 28.11.13; Signatários: Luiz Fernando Carvalho Leite, pela Contratante e Joana D'Arc da Silva Nery e Arabela Matos Albano, pela Contratada.

EXTRATO DE TERMO ADITIVO

Espécie: Termo Aditivo nº 2 ao Contrato, Registro nº 23400.11/0056-7 - Fornecimento e Instalação de canal de Comunicação (Link de Internet); Partes: Embrapa Meio-Norte, CNPJ 00.348.003/0133-60 (Embrapa), e a Empresa Brasileira de Telecomunicações - EMBRATEL (Contratada), CNPJ/MF nº 33.530.486/0001-29; Objeto: Prorrogar o prazo de vigência do Contrato Original. Modalidade de Pregão nº 24/2011; Fonte de Recurso: 0100 Valor Global: Inalterado; Vigência: 30/12/2013 a 29/12/2014; Data da Assinatura: 11.12.12; Signatários: Luiz Fernando Carvalho Leite, pela Embrapa, e Rogéria Martins Santos Maranhão e Nubia Almeida Campos Vidotto, pela Contratada.

EMBRAPA MILHO E SORGO

EXTRATO DE CONTRATO Nº 30/2013 - UASG 135016

Nº Processo: 1350163162013. PREGÃO SISPP Nº 84/2013. Contratante: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA -AGROPECUÁRIA. CNPJ Contratado: 02902975000130. Contratado: MINAS SUL EXTINTORES LTDA - ME - Objeto: Prestação de serviço de manutenção, reparo e recarga em extintores de incêndio. Fundamento Legal: Lei 8666/93 e Decreto 5450. Vigência: 11/12/2013 a 10/12/2014. Valor Total: R\$9.677,00. Data de Assinatura: 11/12/2013.

(SICON - 17/12/2013) 135016-13203-2013NE000974

EMBRAPA PANTANAL

RESULTADOS DE JULGAMENTOS
CONVITE Nº 2/2013

A Embrapa pantanal toma publico o resultado da Carta Convite 2/2013, que objetivou a Contratação de empresa de engenharia p/ Construção de Galpão com infraestrutura para pratica de ginastica laboral na sede da Embrapa Pantanal sendo o vencedor a empresa Chafic Lotfi Filho, CNPJ:16.032.765/0001-43, com valor global de R\$ 86.600,38.

EMIKO KAWAKAMI DE RESENDE
Chefe-Geral

(SIDEAC - 17/12/2013) 135018-13203-2013NE000007

PREGÃO Nº 20/2013

A Embrapa Pantanal toma público o resultado do Pregão Eletrônico 20/2013, que objetivou a aquisição de reagentes e materiais de laboratório, cujo valor global foi R\$ 137.377,72 e teve como vencedores os seguintes participantes: Perkinelmer do Brasil Ltda; Pró Análise Química e Diagnóstica Ltda; M.S. Diagnóstica Ltda; Ludwig Biotecnologia Ltda - ME; Carvalhos Produtos para Laboratório Ltda; Spectrum Química e Diagnóstica Ltda - EPP; Teñin Brazil Produtos para Laboratórios Eireli; Medlab Produtos para Laboratório Ltda - ME; Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda - EPP; Diogolab Indústria e Comércio de Artigos para Laboratórios Ltda - ME; Objetiva Produtos e Serviços p/ Laboratório Ltda - EPP; Rosilene Tonatto Spezzini - ME; Rulux Milenium Comercial Ltda - ME; Jklab - Química, Diagnóstica e Segurança Ltda - EPP; Neobio Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda - EPP; Newoptech Comercial Importadora Ltda - EPP; José Danilo da Silva - ME; T. P. Nogueira - EPP; Calibry Metrologia Comércio e Calibração Ltda - ME; Gold Comércio de Equipamentos Ltda - EPP; Conceitual - Comércio de Equipamentos para Laboratórios Ltda - ME; Saint Valen Biotecnologia Ltda - EPP; Heko Ambiental - Produtos e Equipamentos Científicos Eireli - ME; Molecular Biotecnologia e Representação Ltda - ME; PBL Distribuição Ltda - ME; Alphatex Comércio de Produtos científicos Ltda - ME; Biodome Ltda - ME; Maci - Farm Comércio de Material Hospitalar Ltda - ME; Merck S/A Laboratórios Bruch Ltda; GE Healthcare Life Sciences do Brasil - Comércio de Produtos e equipamentos para Pesquisa Científica e Biotecnologia Ltda; Sorbinie Adsorbentes Tecnologia Ltda - ME.

KENNEDY BATISTA ZUANAZZI
Pregoeiro

(SIDEAC - 17/12/2013) 135018-13203-2013NE000007

TOMADA DE PREÇOS Nº 1/2013

A Embrapa Pantanal toma publico o resultado da Tomada de Preços 1/2013, que objetivou a Contratação de empresa de engenharia para execução de Obra de ampliação da Subestação de energia e instalação de SPDA na Sede da Embrapa Pantanal, sendo vencedora a empresa Gomes & Azevedo Ltda - ME, com o valor global de R\$ 629.097,46.

EMIKO KAWAKAMI DE RESENDE
Chefe-Geral

(SIDEAC - 17/12/2013) 135018-13203-2013NE000007

EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE

AVISO DE LICITAÇÃO
PREGÃO Nº 50/2013 - UASG 135024

Nº Processo: 339/2013. Objeto: Pregão Eletrônico - Contratação de empresa especializada para execução de serviços de lançamento de cabeamento óptico e cabeamento estruturado, com fornecimento e instalação de peças, componentes, materiais e mão-de-obra para a Embrapa Pecuária Sudeste. Total de Itens Licitados: 00001. Edital: 18/12/2013 de 08h00 às 11h30 e de 14h às 17h30. Endereço: Fazenda Canchim com Acesso Pelo Km 234 da Rod. Washington Luiz Rural - SAO CARLOS - SP. Entrega das Propostas: a partir de 18/12/2013 às 08h00 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 31/12/2013 às 08h30 site www.comprasnet.gov.br.

MAURICIO MELLO DE ALENCAR
Chefe-Geral

(SIDEAC - 17/12/2013) 135024-00001-2013NE000001

EMBRAPA PESCA E AQUICULTURA

EXTRATO DE TERMO ADITIVO

Espécie: Termo Aditivo nº 3 ao Contrato de Prestação de Serviços de Técnicos Especializados para Fornecimento, Customização e Instalação de I (uma) Licença de Software, celebrado entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPJ: 00.348.003/0019-40 e a OOBJ Tecnologia da Informação Ltda. CNPJ: 09.553.244/001-76. Objeto: Prorrogação da vigência do Contrato original por mais 12 (doze) meses, com término em 13/12/2014. Data da assinatura: 13/12/2013. Signatários: Carlos Magno Campos da Rocha, pela Embrapa e Sr. Jonathas Reis Pires Carrão, pela Contratada.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS
E BIOTECNOLOGIA

EXTRATO DE TRANSFERÊNCIA

Espécie: Termo de Transferência de Material; Licitação: Não se aplica; SAIC/AJU: 22200.13/0158-3; Objeto: Estabelecer as condições para remessa de genótipos de Cogumelo Rei da Embrapa para a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, conforme Anexo I; Partes: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR; Data da assinatura: 31/10/2013; Vigência: O presente Acordo terá vigência de 30 (trinta) anos; Signatários: Mauro Carneiro pela EMBRAPA e Carlos Eduardo Cantarelli pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

EMBRAPA RONDÔNIA

RESULTADOS DE JULGAMENTOS
PREGÃO Nº 20/2013

Processo: 222/13- Objeto: Sementes Diversas - A Embrapa Rondônia toma público o Resultado do Pregão Eletrônico nº 020/2013 -Empresas Vencedoras: B & G Comércio e Serviços Ltda- ME, Valor R\$ 2.245,80; S6 Sementes Comércio Ltda, Valor R\$ 781,78; Del Corso Ind. Com. e Representação Ltda. Valor R\$ 7.883,10.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135001-13203-2013NE000001

PREGÃO Nº 26/2013

Processo 226/13 - A Embrapa Rondônia toma público o Resultado do Pregão Eletrônico nº 26/2013 Objeto: Material de Laboratório- Empresas Vencedoras: Maná Lab. Distribuidora Ltda, Valor, valor R\$ 1.206,01; Aurilabor Comercial Ltda, va lor R\$ 226,50; Marcos Roberto Meints -ME,valorR\$ 2.108,32.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135001-13203-2013NE000001

PREGÃO Nº 31/2013

Processo 238/13- Objeto: Aquisição de Equipamentos Agrícolas, Medição e Informática. A Embrapa Rondônia toma público o resultado do Pregão Eletrônico nº 031/2013 Empresas Vencedoras: Btue Paris Licitações Ltda, Valor R\$ 459,00; Unity Inst. Teste Medição Ltda, Valor R\$ 300,00; V. Máquinas Agrícolas e Ind. Ltda, Valor R\$ 29.890,00.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135001-13203-2013NE000001

PREGÃO Nº 32/2013

Processo: 241/13-Objeto: Aquisição de Poltronas p/ Auditório. A Embrapa Rondônia toma público o resultado do Pregão Eletrônico nº 32/2013. Empresa Vencedora: Aurus Comercial Distribuidora Ltda, Valor R\$ 148.200,00.

(SIDEAC - 17/12/2013) 135001-13203-2013NE000001

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.



PARECER: 2018-10/2018 - CEUA
PROCESSO Nº: 23064.008895/2018-19
INTERESSADO: SERGIO MIGUEL MAZARO

Dois Vizinhos, 12 de junho de 2018.

PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

| | |
|---------------------------------|--|
| Título: | Compostos bioativos de <i>Ganoderma lucidum</i> na indução de resistência a oídio em soja e a toxicidade a organismos não- alvo. |
| Área Temática: | Sergio Miguel Mazaro |
| Pesquisador / Professor: | Fitopatologia; Ciências Biológicas: Morfologia / Embriologia / Toxicologia |
| Instituição: | UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS DOIS VIZINHOS |
| Financiamento: | Não há |
| Versão: | 02 |

| PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA | Protocolo nº 2018-10 |
|---|----------------------|
| <p>Apresentação do Projeto: Ativadores biológicos, como o <i>Ganoderma lucidum</i>, começam a constituir uma nova classe de pesticidas, sendo chamadas de “fungicidas de quarta geração”. Apresentam modo de atuação diferente dos pesticidas até agora desenvolvidos, visto que na maioria dos casos não exibem efeito direto sobre o patógeno, mas ativam mecanismos de defesa das plantas, tornando sintéticos, busca-se o controle alternativo e biológico. Dessa forma, estudos que busquem confirmar a ação não tóxica em espécies não alvo, se torna de suma importância. Uma técnica muito utilizada in vivo incluem injeções nas membranas de ovos de galinha doméstica (<i>Gallus domesticus</i>), entre as quais a câmara de ar da casca ou na membrana vitelínica (SNEDDON ET AL., 1998). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho será de desenvolver um biofungicida a partir de metabolitos secundários do <i>Ganoderma lucidum</i>, visando o controle do mofo cinzento. E também avaliar o efeito toxicológico deste biofungicida durante fases do desenvolvimento embrionário de <i>Gallus gallus</i> (galinha). O projeto será desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV. O desenho experimental será dividido em 6 grupos: 1 – Grupo controle. 2- Grupo veículo (ovos injetados com 100µl de soro fisiológico). 3 - Grupo Metabolito <i>Ganoderma lucidum</i> (ovos injetados com 100µl de solução de extrato vegetal a 5%). 4 - Grupo Metabolito <i>Ganoderma lucidum</i> (ovos injetados com 100µl de solução a 0,5%). 5 - Grupo Metabolito <i>Ganoderma lucidum</i> (ovos injetados com 100µl de solução de extrato vegetal a 0,05%). 6. Grupo Metabolito + <i>Ganoderma lucidum</i> (ovos injetados com 100µl de suspensão dos fungos, na concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/ml). Serão utilizados 40 ovos para cada grupo experimental, totalizando 240 ovos. Os embriões serão expostos às diferentes soluções do biofungicida, no tempo E0 (para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente natural), através de injeção nas concentrações estabelecidas dos grupos experimentais, diretamente na câmara de ar. Após as injeções, os ovos serão incubados em incubadora BOD, sob temperatura controlada a 38°C e umidade e ventilação constante. No terceiro dia de incubação, após a abertura do ovo, será avaliada a frequência cardíaca dos embriões. Na sequência, os embriões vivos serão eutanaziados, coletados e preparados através da técnica de montagem total em lâmina histológica para a análise morfológica segundo Hamburger e Hamilton (1951). A análise morfométrica será realizada na mesma lâmina de montagem total utilizada para a análise morfológica. O comprimento embrionário será expresso em porcentagem e mensurado através da medida do comprimento dos segmentos definidos entre os eixos das flexuras cefálica, cervical e caudal. As mensurações serão realizadas com o software Image J (NIH).</p> | |
| <p>Objetivo: O objetivo deste trabalho será de desenvolver um biofungicida a partir de metabolitos secundários do <i>Ganoderma lucidum</i>, visando o controle do mofo cinzento. E também avaliar o efeito toxicológico deste biofungicida durante fases do desenvolvimento embrionário de <i>Gallus gallus</i> (galinha).</p> | |
| <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>Riscos: Os riscos possíveis do presente projeto são classificados conforme o CONCEA em Grau de Invasividade Grau 1, ou seja, procedimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse animal.</p> <p>Benefícios: Em função da contaminação ambiental, através do uso intenso de fitossanitários sintéticos, torna-se importante a busca por sistemas alternativos de produção. Nesses sistemas, são empregados produtos alternativos, de origem natural, como a produção de fungos em meio líquido para a extração de suas substâncias, que demonstrem ação fungicida ou fungitóxica para fungos causadores de doenças em viveiros florestais. Na embriotoxicologia, a utilização do embrião de ave tem sido fortemente ampliada, pois seu desenvolvimento externo evita que determinadas análises, como a exposição a contaminantes, possam sofrer alterações devido a interação embrião/progenitor. Além disso, os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e humanos se assemelham, permitindo que possamos extrapolar os resultados quanto aos riscos da exposição humana a agentes contaminantes.</p> | |
| <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática: Apresenta relevância científica e aplicação na área.</p> | |
| <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>Somente o formulário unificado e a declaração do Veterinário foram apresentados.</p> <p>Os demais termos (documentos) não foram apresentados.</p> | |

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atualizar a previsão de execução no formulário unificado (item 2).

Considerando-se que o projeto obteve parecer 'não aprovado' em sua última avaliação, considera-se uma nova submissão (o que gera um novo número de protocolo) e assim todos os documentos devem ser reapresentados, com os cronogramas devidamente atualizados. A data de início prevista é abril de 2018. Os procedimentos só podem ser iniciados após aprovação pela CEUA. Considerando-se que a próxima reunião realizar-se-á no dia 08 de maio, a data de início deve ser ulterior a esta.

Situação do Parecer: Aprovado, após ter atendido a todas as pendências solicitadas.

Considerações Finais a Critério da CEUA:

Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

O pesquisador tem até 30 dias após a ciência do parecer com pendência, para responder aos quesitos formulados pela CEUA-UTFPR.

| | |
|-----------------------------|---|
| Vigência do projeto: | 01/07/2018 a 01/10/2018. |
| Finalidade | (<input type="checkbox"/>) Ensino (<input checked="" type="checkbox"/>) Pesquisa Científica |
| Espécie/linhagem: | Ovos férteis de <i>Gallus gallus</i> (galinha)/Linhagem Cobb |
| Número de animais: | 240 ovos férteis |
| Peso/Idade: | Ovos férteis com peso médio entre 60 e 65g\ Embriões com 3 dias de incubação |
| Sexo: | Não definido, pois se trata de embriões com 3 dias de incubação. |
| Origem: | Adquiridos de incubatório comercial. |

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por NÉDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DA COMISSÃO, em 15/06/2018, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.uVpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0291460 e o código CRC 8F341187.