

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de
plantas de fumo contra o *Tobacco mosaic virus* (TMV)**

André Boldrin Beltrame

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2005**

André Boldrin Beltrame
Engenheiro Agrônomo

**Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo
contra o *Tobacco mosaic virus* (TMV)**

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Beltrame, André Boldrin

Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o *Tobacco mosaic virus* (TMV) / André Boldrin Beltrame. - - Piracicaba, 2005.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Algas 2. Controle biológico – Fitossanidade 3. Fumo 4. Metabolismo vegetal – Alteração
5. Mosaico – Doença de planta 6. Vírus de plantas I. Título

CDD 632.8

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais Helenice e João Américo,
Irmãs Aline e Camila
e Namorada Ana Elisa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sérgio Pascholati pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo: Camila, Célia, Daiane, Ely, Júlio, Leonardo Cavalcante, Leonardo Toffano, Maria Cristina, Marizete, Nelson, Patrícia, Paulo, Solange, Ricardo e, em especial, ao Danilo, ao Maurício, a Nívea, ao Odair e ao Robson que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Carmen, Fernanda, Pedro Arthuso, Rodolfo e Silvia pela colaboração no decorrer do curso.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1.1 Controle Biológico	11
2.1.2 Indução de resistência.....	13
2.1.3 Ativação dos mecanismos de defesa	15
2.1.3.1 Sinalização	15
2.1.3.2 Rotas metabólicas	16
2.1.3.3 Proteínas relacionadas à patogênese	18
2.1.3.4 Fenóis e fitoalexinas	20
2.1.4 <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV).....	22
2.1.5 Cianobactérias e algas eucarióticas	23
2.1.5.1 Aspectos gerais	23
2.1.5.1.1 Cianobactérias.....	23
2.1.5.1.2 Algas eucarióticas	24
2.1.5.2 Propriedades farmacológicas de cianobactérias e de algas.....	25
2.1.5.3 Efeito de cianobactérias e de algas sobre animais.....	26
2.1.5.4 Efeito de cianobactérias e de algas sobre o homem	26
2.1.5.5 Efeito de cianobactérias e de algas sobre fitopatógenos	27
2.2 Materiais e Métodos	29
2.2.1 Obtenção e manutenção das cianobactérias e algas eucarióticas	29
2.2.2 Quantificação da clorofila e do peso seco	29
2.2.3 Obtenção dos preparados das algas	30
2.2.4 Obtenção e manutenção das plantas hospedeiras.....	30
2.2.5 Obtenção e manutenção do TMV	30
2.2.6 Efeito da concentração do TMV no número de lesões em folhas de fumo.....	31
2.2.7 Efeito local de suspensões das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo.....	31
2.2.8 Efeito local e sistêmico de suspensão das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo	32

2.2.9	Efeito das preparações das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo	33
2.2.10	Efeito inibitório das algas sobre o TMV	33
2.2.11	Obtenção das amostras para a realização dos testes bioquímicos	33
2.2.12	Ensaio enzimático para a determinação da atividade de β -1,3-glucanase	34
2.2.13	Ensaio enzimático para a determinação da atividade de peroxidases	35
2.2.14	Verificação do conteúdo total de fenóis	35
2.2.15	Verificação de espécies reativas de oxigênio	36
2.3	Resultados.....	37
2.3.1	Distinção das algas procarióticas das eucarióticas	37
2.3.2	Quantificação da clorofila a e do peso seco	37
2.3.3	Efeito da concentração do TMV no número de lesões em folhas de fumo.....	38
2.3.4	Efeito local de suspensões das algas na redução dos sintomas provocada por TMV em plantas de fumo.....	39
2.3.5	Efeito local e sistêmico de suspensão das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo	41
2.3.6	Efeito das preparações das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo.....	44
2.3.7	Efeito inibitório das algas sobre o TMV	48
2.3.8	Ensaio enzimático para a determinação da atividade de β -1,3-glucanase	49
2.3.9	Ensaio enzimático para a determinação da atividade de peroxidases	52
2.3.10	Verificação do conteúdo total de fenóis	55
2.3.11	Verificação de espécies ativa de oxigênio	58
2.4	Discussão	63
3	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO	84
	APÊNDICE	86

RESUMO

Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o *Tobacco mosaic virus*

As algas produzem uma grande diversidade de compostos com atividade biológica, inclusive que agem diretamente sobre vírus ou como indutores de fitoalexinas. Em vista disso, foi investigada a redução de sintomas causados por *Tobacco mosaic virus* (TMV) em plantas de fumo tratadas com cianobactérias ou algas eucarióticas, além de se tentar elucidar o modo de ação das algas no patossistema estudado. Quando as plantas de fumo foram tratadas dois dias antes da inoculação, foi verificado que suspensões dos isolados 004/02, 008/02, 061/02, *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp. 61, bem como as preparações do conteúdo intracelular do isolado 004/02 (4 C) e do filtrado do meio de cultivo do isolado 061/02 (61 M) apresentaram efeito na redução dos sintomas de TMV em plantas de fumo, cultivar TNN. Além disso, foi estudado o efeito direto das algas sobre as partículas de vírus. Os resultados mostraram que os isolados *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21, *Nostoc* sp. 61 e 090/02 apresentam compostos que agem diretamente sobre o TMV. Para tentar elucidar o mecanismo de ação das algas no patossistema estudado, diversos parâmetros bioquímicos foram investigados. Foi detectado que a preparação 4 C aumentou a atividade de peroxidases e que todos os tratamentos analisados reduziram a atividade de β -1,3-glucanase em folhas de fumo a partir do quarto dia após o tratamento das plantas. Por sua vez, as suspensões dos isolados 008/02 e 061/02 e a preparação 61 M proporcionaram maior acúmulo de superóxido, enquanto que a preparação 4 C reduziu o acúmulo de peróxido de hidrogênio, em relação aos controles água destilada e meio de cultura BG 11, 37 horas após a inoculação do vírus. Em vista disso, as algas podem ser utilizadas como agentes de controle biológico, por apresentar ação direta sobre fitopatógenos ou alterarem o metabolismo de plantas, o que pode estar associado com a síntese de compostos de defesa.

Palavras chaves: algas, TMV, controle biológico, alterações metabólicas

ABSTRACT

Effect of cyanobacteria and eukaryotic algae on the resistance of tobacco plants against *Tobacco mosaic virus*

Algae produce several different compounds that show biological activity, including ones with antiviral activity or that act as phytoalexin inducers. Thus, it was investigated the reduction of *Tobacco mosaic virus* (TMV) symptoms on tobacco plants treated with cyanobacteria or eukaryotic algae, and it was studied the way of action of algae on the studied pathosystem. When the tobacco plants were treated two days before the inoculation, it was verified that the suspension of 004/02, 008/02, 061/02 *Anabaena* sp., and *Nostoc* sp. 61 strains as well as the intracellular preparation of 004/02 strain (4 C) and the medium filtrated from 061/02 strain (61 M) reduced TMV symptoms on tobacco plants, cultivar TNN. Furthermore, it was studied the direct effect of the algae suspensions on virus particles. The results showed that *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21, *Nostoc* sp. 61 and 090/02 strains have compounds with direct activity on TMV. To try to elucidate the way of the action of algae, on the studied pathosystem, several biochemical parameters were investigated. It was seen that the preparation 4 C increase peroxidase activity and all treatments decrease β -1,3-glucanase activity on tobacco leaves from the forth day on after the treatment. Moreover, 008/02 and 061/02 strains and the 61 M preparation caused higher superoxide accumulation, and the preparation 4 C decreased hydrogen peroxide accumulation when compared to the controls distilled water and BG 11 medium 37 hour after virus inoculation. In this way, the algae could be a biocontrol agents, because it shows direct action on phytopathogens and/or change the metabolism of the plants, that could be associated with the synthesis of deffence compounds.

Keywords: cyanobacteria, TMV, biological control, metabolic alterations.

1 INTRODUÇÃO

A população mundial está crescendo e, conseqüentemente, a demanda por alimento. Em vista disso, o homem tem buscado novas técnicas para aumentar a produtividade das culturas, como o uso de irrigação, adubação química pesada, variedades mais produtivas e mecanização.

Nesse contexto, o melhorista, por muitos anos, visou a seleção de variedades de plantas com alta produtividade e ignorou os mecanismos naturais de defesa das mesmas, com isso as novas cultivares ficaram mais susceptíveis às doenças. Para remediar esse problema, foi necessário desenvolver outros métodos de controle, dentre os quais o que se obteve maior sucesso foi o controle químico. Não se pode negar que a aplicação de produtos químicos é fundamental para o controle de muitas doenças de plantas, porém, o uso indiscriminado deles, além de contaminar o ambiente e favorecer o aparecimento de problemas em animais e ao homem, também favorece o surgimento de raças resistentes a esses compostos (REIMANN; DEISING, 2005).

Em vista desse processo, foi necessário iniciar uma busca por um tipo de controle alternativo aos produtos químicos para o combate a doenças, como solarização, irradiação UV, rotação de culturas, imunização biológica, controle biológico e indução de resistência. É mister lembrar que essas medidas não irão acabar com os a aplicação de produtos químicos, mas sim reduzir a utilização dos mesmos.

O controle biológico visa controlar patógenos de plantas com outros organismos. As cianobactérias e as algas eucarióticas apresentam-se como candidatas para o controle de doenças de plantas, pois podem ser produzidas em larga escala, além de sintetizarem muitos compostos com atividade biológica sobre microrganismos, inclusive fitopatogênicos. Além disso, elas podem incitar o acúmulo de fitoalexinas em tecidos vegetais (DI PIERO, 1999; RAO; SARADA; RAVISHANKAR; 1996), o que indica a ativação dos mecanismos de resistência em plantas.

A indução de resistência é a ativação dos mecanismos de resistência que estão latentes nas plantas através de agentes bióticos ou abióticos, chamados de elicitores.

Apesar de muitas espécies de cianobactérias e algas eucarióticas produzirem compostos biologicamente ativos, poucos trabalhos foram realizados para se tentar controlar doenças em vegetais e, na sua grande maioria, os pesquisadores restringiram-se em verificar apenas o efeito *in vitro* das mesmas sobre fitopatógenos. Assim sendo, o

objetivo desse trabalho foi verificar o efeito de cianobactérias e de algas eucarióticas na redução dos sintomas do TMV em plantas de fumo, bem como elucidar o possível modo de ação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1.1 Controle Biológico

O controle biológico é uma alternativa para o controle de fitopatógenos (ELSON; SCHISLER; BOTHAST, 1997; LARKIN; FRAVEL, 1998; MAO et al., 1996). Assim, Cook e Baker (1983) definiram o controle biológico de doenças de plantas como “a redução do potencial de inóculo e/ou patogenicidade, pelo uso de um ou mais organismos, exceto o homem”.

O mecanismo de ação dos agentes de biocontrole pode ser ilustrado através de três métodos básicos de controle: antibiose, parasitismo e competição.

A antibiose baseia-se na produção de substâncias que agem sobre os fitopatógenos, as quais são produzidas pelos organismos antagonistas a fim de se protegerem dos demais microrganismos existentes no habitat que ocupam (LUZ, 1993). Uma protease produzida pelo isolado 3.1T8 de *Lysobacter enzymogenes* pode ser a molécula que reduz o crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Didymella lycopersici*, *Cladosporium fulvum*, *Corynespora cassicola*, *Verticillium albo-atrum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Pythium intermedium* e *Phyitium aphanidermatum* (FOLMAN; POSTMA; VAN VEEN, 2003). Getha e Vikineswary (2002) verificaram que o isolado G 10 de *Streptomyces violaceusniger* produz um metabólito capaz de inibir tanto *in vitro*, como em solo esterilizado o fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, além de deformar e provocar a hidrólise das hifas desse fitopatógeno. Taechowisan et al. (2005) isolaram e identificaram, a partir de meio de cultivo, os compostos, produzidos pelo isolado CMUAc130 de *Streptomyces aureofaciens*, 5,7-dimetoxi-4-p-metoxifenilcoumarina e 5,7-dimetoxi-4-fenilcoumarina, os quais apresentaram efeito inibitório *in vitro*, respectivamente, sobre *Colletotrichum musae* e *F. oxysporum*.

Diversos trabalhos mostram a capacidade antagônica de várias espécies de leveduras contra diferentes fitopatógenos. Saligkarias; Gravanis e Eptona (2002) verificaram que o controle de *Botrytis cinerea* em tomate por *Candida guilliermondii* e *C. olephila* é devido à produção e excreção de quitinase e glucanase. Ademais, a produção de β -1,3-glucanase por *Pichia anomala* provocou deformações nas extremidades das hifas de *B. cinerea* (JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998).

Vários isolados de *Trichoderma* spp. e de *Clonostachys rosea* inibiram a formação *in vitro* de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*, bem como reduziram a expressão dos sintomas causados por *Moniliophthora roreri* e *Phytophthora palmivora* em plântulas de cacaueteiro. O isolado de *Trichoderma* sp. T-3 também reduziu a formação dos sintomas de vassoura-de-bruxa em plântulas de cacaueteiro (KRAUSS; SOBERANIS, 2001). Outros trabalhos mostram que isolados de *Trichoderma* spp. produzem enzimas líticas extracelulares, tais como β -1,3-glucanase, celulase, quitinase e protease (SANZ et al., 2004; RAMOT et al., 2004; MONTERO et al., 2005). Além disso, espécies de *Trichoderma* produzem toxinas, tais como gliotoxina e gliovirina, (WILHITE; LUMSDEN; STRANEY, 1994; KAPAT; ZIMAND; ELAD, 1998).

Diferentes organismos podem produzir compostos voláteis que agem sobre os fitopatógenos. Fialho (2004) mostrou que diversos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* produzem compostos voláteis que inibem o crescimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta em citros. Compostos voláteis, produzidos por *Muscodor albus*, proporcionaram menor taxa de tombamento de plântulas de brócolis provocado pelos patógenos de solo *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora capsici* em casa-de-vegetação (MERCIER; MANKER, 2005). Diferentes espécies de *Pseudomonas* produzem os compostos voláteis benzotiazol, ciclohexanol, n-decanal, dimetil trisulfeto, 2-etil 1-hexanol, e nonana, os quais reduziram a germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* em pelo menos 54%, bem como apresentaram efeito fungicida sobre o micélio desse fitopatógeno (FERNANDO et al., 2005).

Já o mecanismo de parasitismo, consiste na degradação da parede celular ou estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos, com posterior penetração no fungo e absorção do conteúdo celular (CHET, 1987). Assante et al. (2004) mostraram que *Cladosporium tenuissimum* inibe a germinação de uredosporos de *Uromyces appendiculatus* *in vitro* por parasitar essa estrutura reprodutiva. Porém, o parasitismo não foi eficiente o suficiente para reduzir a severidade de ferrugem em plantas de feijão. Em outro trabalho, Madsen e Neergaard (1999) verificaram que *Pythium oligandrum* parasitavam escleródios de *S. sclerotiorum* *in vitro*.

Hifas de *Pythium ultimum* e *R. solani* foram parasitadas em placas de Petri pelo isolado J1446 de *Gliocladium catenulatum* (McQUILKEN; GEMMELL; LAHDENPERA, 2001). Nesse trabalho, também foi verificado que *G. catenulatum* reduziu, em sementeiras,

o tombamento de amor-perfeito e de *Antirrhinum majus* provocado por *P. ultimum*, e o tombamento de *Alyssum saxatile* e *Salvia fulgens* provocado por *R. solani*.

Finalmente, o fenômeno do controle biológico através da competição envolve, principalmente, a disputa por nutrientes e espaço. Tanto a velocidade de crescimento, quanto à eficiência na absorção de determinadas formas de carbono e nitrogênio determinam a sobrevivência dos microrganismos em alguns ambientes (CAMPBELL, 1994).

Isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos podem ser utilizados como medida de controle de isolados patogênicos. Esse controle pode ser devido à competição por carbono ou por sítios de infecção (ALABOUVETTE; LEMANCEAU; STEINBERG, 1996).

Garmendia; Goicoechea e Aguirreolea (2005) evidenciaram que em rizosféra de pepino colonizada com a micorriza arbuscular *Glomus deserticola*, existe uma redução dos sintomas provocados por *Verticillium dahliae* quando as plantas hospedeiras estão em solos bem irrigados. Os autores sugerem que existe a competição por recursos entre os fungos quando vão penetrar no tecido hospedeiro.

Espécies de *Pseudomonas* fluorescentes produzem sideróforos, que são compostos que apresentam a capacidade de quelar ferro. Os isolados WCS358r *Pseudomonas putida*, WCS374r *P. fluorescens*, WCS417r *P. fluorescens* e 7NSK2 *P. aeruginosa* inibiram o crescimento de *Ralstonia solanacearum in vitro* devido à produção de sideróforos (RANA, et al., 2005). Além disso, Dey et al. (2004) verificaram que vários isolados de *P. fluorescens* controlaram *in vitro* *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Sclerotium rolfsii*, mas em testes *in vivo*, realizados em amendoim, o controle não foi satisfatório.

Além da produção de enzimas extracelulares e de compostos voláteis, as leveduras podem exercer ação de biocontrole por competir por nutrientes. Segundo Droby et al. (1989), o controle de *Penicillium digitatum* e *P. expansum* por *Debaryomyces hansenii* foi prejudicado com a adição de nutrientes exógenos em citros.

2.1.2 Indução de resistência

As plantas possuem mecanismos de resistência pré-formados, ou seja, estão presentes antes do contato com o patógeno, bem como mecanismos de resistência pós-formados, isto é, são ativados ou aumentam a concentração de compostos pré-existentes

após a infecção do patógeno. Ambos mecanismos podem ser estruturais ou bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

É mister lembrar ainda que na natureza a resistência é a regra e a suscetibilidade exceção, (AGRIOS, 1997). Porém, o melhoramento genético visou, por muito tempo, a seleção de variedades que apresentavam alta produtividade, boas características agronômicas e comerciais e ignorou os mecanismos naturais de resistência das plantas. A resistência induzida, em vista disso, consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes externos (indutores), sem qualquer alteração do genoma da planta, além de ocorrer de maneira não-específica, através da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa, tais como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas, acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo (BONALDO, PASCHOLATI, ROMEIRO, 2005).

Como não é específica, agride menos o homem e o ambiente que os agrotóxicos, não existe, aparentemente, quebra de resistência e a proteção pode ser local ou sistêmica; então o interesse na indução de resistência como medida de controle de doenças de plantas estimulou tanto a comunidade acadêmica, bem como empresas. Esse fato pode ser verificado pelo número considerável de indutores de defesa comerciais, tais como Oryzamate[®], Bion[®], Oxycom[®], Messenger[®], Elexa[®], Phytogard[®], Milsana[®], Canary-Bac[®], Canary-Bot[®].

Conforme Siegrist; Muhlenbeck e Buchenauer (1998), esta parece ser uma alternativa viável para o controle de doenças em curto prazo, principalmente quando se pensa em substituir os agrotóxicos. Porém, essa nova tecnologia pode apresentar desvantagens, como reduzir a colonização de micorrizas devido ao acúmulo de ácido salicílico (COSTA; RÍOS-RUIZ; LAMBAIS, 2000; MEDINA et al. 2003), a resistência é parcial, incompleta e pode requerer reativações temporárias (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005), além de promover gasto energético, o que pode provocar redução na produção (HAMMERSCHMIDT, 2005).

2.1.3 Ativação dos mecanismos de defesa

2.1.3.1 Sinalização

Para que os mecanismos de defesa pós-formados sejam ativados, a planta deve reconhecer o patógeno, emitir um sinal primário e ativar genes de defesa ou aumentar a atividade de enzimas importantes para a defesa vegetal (VAN LOON; VAN STRIEM, 1999).

O reconhecimento é dado por meio de um elicitor que, segundo Smith (1996), é uma molécula capaz de estimular resposta de defesa na planta. A natureza dessa molécula é muito variada, tais como, microrganismos, ácido salicílico, vitamina B1, luz UV, glucana (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; LU; CHEN, 2005; AHN; KIM; LEE, 2005; STEVENS et al., 1999; ANDREU et al., 1998).

Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva a ativação dos mecanismos de defesa das plantas. Um dos primeiros eventos na interação planta-patógeno é a explosão oxidativa, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (WU et al., 1997). As primeiras ROS produzidas são o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GRANT; LAAKE, 2000). Um dos resultados da explosão oxidativa é a reação de hipersensibilidade (RH), um mecanismo de defesa imediata da célula infectada (KOMBRINK; SCHMELZER 2001) que é sucedido pela ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR). Diversos autores acreditam que a expressão da SAR só acontece se houver a RH (COSTET et al., 1999; HAMMERSCHMIDT, 1999). As alterações na fisiologia das células vegetais devido a RH incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, perda de íon de potássio (K^+) e de cálcio (Ca^{2+}) e influxo de íon de hidrogênio (H^+) e de cloro (Cl^-) pelas células, destruição de compartimentos, espessamento da parede celular e formação de cutícula, além de biossíntese de compostos de defesa (FRITIG; HEITZ; LEAGRAND, 1998).

Outra molécula sinalizadora é o óxido nítrico (ON). Delledonne et al. (1998) observaram efeito sinérgico entre o H_2O_2 e o ON na expressão de resposta de defesa em folhas de *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae*, bem como na sinalização da via do ácido salicílico (AS) (SONG; GOODMAN, 2001) e na ativação de genes, como o da fenilalanina amônia-liase (FAL) e o da chalcona sintase (DELLEDONNE et al., 1998). O aumento da expressão destas enzimas estimula a via dos fenilpropanóides, o que resulta

na produção de vários compostos de defesa de plantas, como as fitoalexinas (WANG et al., 2003; SHIRLEY, 1996). Estudos recentes focam no envolvimento do ON na RH, agindo de modo sinérgico com as ROS ou de maneira independente (CLARKE et al., 2000; DELLEDONNE et al., 1998). Yamamoto et al. (2004) mostraram que a síntese de ON induzida por um elicitador sintético levou à ativação de uma proteína quinase, importante na cadeia de sinalização da resistência induzida, e à expressão de genes *hsr* (hipersensitive-related), o que ocasionou a morte de células de fumo através da reação de hipersensitividade. Além disso, plantas de fumo tratadas com ON, apresentaram aumento na concentração de AS e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteína-RP) (SONG; GOODMAN, 2001).

As ROS também estão envolvidas na indução de diferentes genes de defesa, como o gene *Ep5C* de *Arabidopsis*, responsável pela síntese de peroxidases, que é expresso rapidamente pelo H₂O₂ (COEGO et al., 2005).

2.1.3.2 Rotas metabólicas

Após a emissão do sinal primário, duas rotas metabólicas estão envolvidas na síntese de compostos de defesa: uma dependente de AS e outra independente de AS. No primeiro caso, o composto sinalizador é o próprio AS e na outra rota os sinalizadores são o etileno e/ou o ácido jasmônico (KUNKEL; BROOKS, 2002). No geral, as plantas respondem mais aos patógenos biotróficos, com a ativação da rota do AS, porém ativam a rota do etileno-jasmonato quando atacadas por patógenos necrotróficos ou herbívoros (TON et al., 2002).

Plantas infectadas com fitopatógenos apresentam acúmulo de AS em seus tecidos. Além disso, a aplicação de AS exógeno resulta no incremento da resistência da planta contra vários fitopatógenos (RYALS; NEUENSCHWANDER, 1996). É mister lembrar ainda, que plantas transgênicas, as quais não acumulam esse composto, além de não ativarem os genes codificadores de proteínas-RP, também são mais vulneráveis aos ataques de fitopatógenos (GAFFNEY et al., 1993). Por outro lado, plantas transgênicas que convertem corismato em AS são mais resistentes a diversos fitopatógenos (VERBERNE et al. 2000).

Plantas de *Arabidopsis* tornaram-se resistentes a *Pseudomonas syringae* entre 5 e 7 semanas após a germinação das sementes. Essa resistência é devida ao acúmulo de AS nos espaços intercelulares das plantas (CAMERON; ZATON, 2004). Plantas de lírios

tratadas com AS nas raízes ou nas folhas tiveram os sintomas de requeima e necrose, provocados por *Botrytis ellpitica*, reduzidos em pelo menos 50 % em relação às não tratadas (LU; CHEN, 2005).

O etileno, por sua vez, é um hormônio vegetal gasoso e está envolvido em vários processos fisiológicos, além de ser produzido após a infecção de patógenos e de ativar mecanismos de defesa das plantas quando aplicado exógenamente, o que leva a acreditar na sua ligação com a SAR (BOLLER, 1990). Além disso, esse hormônio é requerido para a produção e/ou transmissão dos sinais sistêmicos produzidos pela SAR (VERBERNE et al., 2003) e para a expressão de proteínas-RP (JACOBS; DRY; ROBINSON, 1999). O precursor do etileno é o 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), o qual é produzido como resultado do ciclo de Yang (ABELES; MORGAN; Jr. SALTVEIT, 1992). O primeiro passo desse ciclo é catalisado por S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase. Adenosil liga-se com L-metionina, o que resulta em SAM. No passo seguinte, SAM é convertido em ACC e 5-metiladenosina, reação catalisada pela ACCsintetase. Finalmente, ACC é oxidado em etileno pela ACCoxidase (GRICHKO; GLICK, 2001).

Knoester et al. (1999) mostraram que plantas de *Arabidopsis*, insensíveis ao etileno, tratadas com a rizobactéria *Pseudomonas fluorenses* WCS417r, eram mais suscetíveis a *Pseudomonas syringae* pv. *tomatoe* que plantas sensíveis a esse fitohormônio. Outros estudos igualmente mostram que o etileno é um importante sinalizador para a expressão de resistência de plantas a doenças (VERBERNE et al., 2003; KNOESTER et al., 1998; KNOESTER et al., 2001). Todavia, Lund; Stall e Klee (1998) mostraram que um mutante natural de tomate, insensível ao etileno, apresentou significativa redução nos sintomas provocados por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Ademais, outros trabalhos também mostram que esse hormônio não é importante para a expressão da resistência de plantas (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX; 1997; MAUCH; HADWIGER; BOLLER, 1984).

Os trabalhos acima mostram que ainda não existe uma conclusão com relação da importância do etileno no processo de sinalização para a expressão de resistência de plantas a doenças.

O ácido jasmônico e seus derivados estão distribuídos amplamente nos tecidos vegetais (BOSTOCK, 1999) e estão envolvidos em vários eventos fisiológicos tais como, maturação de frutos e de pólen, crescimento e senescência de raízes, além de induzir os eventos tipicamente associados a SAR, como a síntese de osmotina (proteína-PR da

família 5), de chalcona sintase e de FAL (CREELMAN; MULLET, 1997; STICHER; MAUCHMANI; MÉTRAUX; 1997).

Os jasmonatos são sintetizados pela oxigenação do ácido linoléico com lipoxigenases e, então, convertidos no ácido 12-oxo-fitodienoico. Finalmente, a redução do ácido 12-oxo-fitodienoico resulta na produção do ácido jasmônico (CREELMAN; MULLET, 1997). As lipoxigenases são uma classe de enzimas que catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes (BUNKER et al., 1995). Quando o tecido de planta é danificado por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos em que os produtos primários da reação das lipoxigenases, os hidroperóxidos, podem ser metabolizados por duas vias enzimáticas principais: hidroperóxido liase e hidroperóxido ciclase. A hidroperóxido liase produz aldeídos que, possivelmente inibem o crescimento dos patógenos (CROFT; JÜTTNER; SLUSARENKO, 1993). Além disso, os jasmonatos estão envolvidos na biossíntese de fitoalexinas, defensinas e na expressão de genes das proteínas-RP (GUNDLACH et al., 1992; PENNINGCKX et al., 1996; XU et al., 1994).

Yao e Tian (2005) verificaram que a aplicação de metil jasmonato pré ou pós colheita, reduziu a incidência de *Monilinia fructicola* em cereja (*Prunus avivum* L.) 15 e 60 dias após a colheita dos frutos. Além disso, o controle desse patógeno foi mais eficiente com a aplicação de metil jasmonato em pré-colheita. A aplicação de jasmonatos em plantas de batata e tomate proporcionou a redução dos sintomas de requeima nas mesmas, causada por *Phytophthora infestans* (COHEN; GISI; NIEDERMAN, 1993).

2.1.3.3 Proteínas relacionadas à patogênese

As proteínas-RP agem diretamente sobre o patógeno e estão agrupadas em 17 famílias (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Essas proteínas apresentam algumas características que as distinguem das demais proteínas vegetais, tais como estabilidade em pH baixos, em torno de 2,8 (quase a totalidade das demais proteínas das plantas precipita nessa condição), resistência à ação de enzimas proteolíticas, estabilidade sob altas temperaturas (em torno de 60-70 °C), com massa molecular variando entre 8 e 50 kDa e podem estar localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (STINTIZI et al., 1993).

Há dois mecanismos de ação das proteínas-RP. O primeiro mecanismo é hidrolítico sobre a parede celular de fungos e bactérias (YOSHIKAWA; TSUDA; TAKEUCHI, 1993), como as quitinases e glucanases que hidrolisam polímeros de quitina e de glucana, respectivamente, os principais componentes da parede celular dos fungos (VAN LOON; VAN STRIEM, 1999). Já o segundo mecanismo de ação é indireto, com a liberação de elicitores não específicos devido à ação lítica dessas enzimas (YOSHIKAWA; TSUDA; TAKEUCHI, 1993).

As quitinases são proteínas-RP que pertencem as famílias RP-3, 4, 8 e 11. A diferença existente entre essas classes de quitinases é o substrato que elas hidrolisam (VAN LOON; VAN STRIEM, 1999). O indutor comercial acibenzolar-S-metil (ASM) reduziu a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* em plantas de tomate (BAYSAL et al., 2003). Nesse trabalho, foi verificada maior atividade de quitinase em plantas tratadas com ASM em relação às plantas não tratadas 2, 5 e 7 dias após o tratamento, além de maior atividade de peroxidases 5 dias após o tratamento. Di Piero (2003) verificou que o extrato aquoso de *Lentinula edodes*, além de reduzir a severidade de antracnose em pepino, provocou o acúmulo local e sistêmico de quitinases em plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*.

Quanto as glucanases, as mesmas são classificadas como PR-2 e apresentam a capacidade de hidrolisar polímeros de glucana (VAN LOON; VAN STRIEM, 1999). Segundo Nishizawa et al. (2003), plantas transgênicas de arroz que super expressam β -1,3-glucanase são mais resistentes a *Magnaporthe grisea* do que plantas que não super expressam essa proteína-RP. Além disso, as plantas transgênicas apresentaram maior quantidade de lesões características de interações não compatíveis, ou seja, devido à reação de hipersensibilidade. Em outro experimento com plantas transgênicas, Wrobel-Kwiatkowska et al., (2004) verificaram que plantas de *Linum usitatissimum* que super expressaram β -1,3-glucanase eram pelo menos 3 vezes mais resistentes do que as plantas não transformadas. O cultivar de melão PMR-6, resistente a infecção por *Sphaerotheca fusca*, acumulou β -1,3-glucanase 2 dias após a inoculação. Porém, no cultivar Rochet, suscetível, essa enzima só foi detectada 5 dias após a inoculação. Em vista disso, a diferença na velocidade da expressão dessa enzima pode estar relacionada com a resistência ou não do melão a *S. fusca* (RIVERA et al., 2002). Foi verificada por Di Piero (2003) que plantas de tomate tratadas com extratos aquosos de basidiocarpo de

Agaricus blazei tornaram-se mais resistentes a *Xanthomonas vesicatoria*. Além disso, o extrato não exerceu ação direta sobre a fitobactéria, mas estimulou o acúmulo de β -1,3-glucanase no hospedeiro. Por sua vez, plantas de cevada tratadas com goma xantana tiveram os sintomas local e sistêmicos, provocados por *Bipolaris sorokiniana*, reduzidos em pelo menos 80% e as plantas tratadas apresentaram maior atividade de β -1,3-glucanase (CASTRO; BACH, 2004).

Finalmente, as peroxidases (PR-9) são glicoproteínas antioxidantes capazes de catalisar grande número de reações como, produção ou catálise de H_2O_2 , formação de lignina, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos (ALVAREZ et al., 1998; GRIESEBACH, 1981; HIRAGA et al., 2001). Além disso, em cultivares resistentes ou em plantas tratadas com indutores de resistência esse aumento é mais pronunciado que nas relações planta-patógenos compatíveis (RAY; HAMMERSCHMIDT, 1998; GOWDA; BHAT; BHAT, 1989; RONCATO; PASCHOLATI, 1998). Boudjeko et al. (2005) verificaram que em cultivares resistentes de *Xanthosoma sagittifolium* a atividade de peroxidase cresceu 41% 2 dias após a inoculação com *Pythium myriotylum*, porém em cultivares suscetíveis, a atividade dessa enzima cresceu apenas 13%. Em outro trabalho, Egea et al. (2001) verificaram a existência de uma correlação positiva entre a resistência de três cultivares de pimentão a *Phytophthora capsici* e a excreção de peroxidases de culturas celulares dessas variedades inoculadas com esse oomiceto. Por sua vez, Labanca (2002) e Di Piero (2003) verificaram que *S. cerevisiae* e extrato aquoso de basidiocarpo de *L. edodes*, respectivamente, elicitaram a atividade de peroxidase no patossistema pepino-*C. lagenarium*.

2.1.3.4 Fenóis e fitoalexinas

Os fenóis são produzidos por células distribuídas pelo tecido vegetal, ao acaso ou em locais estratégicos. Esses compostos apresentam um anel benzeno ligado à pelo menos uma hidroxila e existem mais de 10.000 estruturas diferentes (TAIZ; ZEIGER, 2004). São sintetizados por diferentes rotas metabólicas e a classe mais abundante é derivada da fenilalanina. Para isso, a fenilalanina amonialiase (FAL) remove uma molécula de amônia do ácido cinâmico (TAIZ; ZEIGER, 2004). As enzimas dessa síntese são associadas ao retículo endoplasmático, o que permite, logo após a produção, que esses compostos sejam armazenados em vesículas na sua forma original ou glicosilada. A

compartimentalização é fundamental para o funcionamento das células, pois os fenóis são tóxicos e devem ser mantidos em sua forma reduzida. A descompartimentalização dos fenóis pode levar a sua rápida oxidação, pela ação das peroxidases, em resposta a uma infecção. Os fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre o patógeno como sobre a célula vegetal e contribuir para a resposta de hipersensibilidade (ISAAC, 1992), sendo esta uma resposta celular extrema por parte da planta podendo levar a um alto grau de resistência à doença (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Essa classe de compostos apresenta duas maneiras de ação: a primeira é para reduzir o crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro como, a deposição de lignina e formação de fenóis de baixo peso molecular (ácido benzóico, fenilpropanóides). A segunda envolve a ativação do metabolismo *de novo* e a síntese de compostos relacionados ao estresse, como as fitoalexinas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

A lignina é um polímero de grupos de fenilpropanóides altamente ramificado e pode ser encontrado nas paredes celulares de diversos tecidos de sustentação e vasculares (TAIZ; ZEIGER, 2004). Nos tecidos lenhosos, esse composto pode estar presente entre 25 a 40% (ISHERWOOD, 1960). Segundo Pascholati e Leite (1995), a lignina apresenta um alto potencial de defesa celular contra o ataque de patógenos por aumentar a resistência da parede celular, dificultar a difusão de toxinas em direção ao hospedeiro e a liberação de nutrientes para os patógenos. Em estudos com culturas de células de pimentão, Egea et al. (2001) verificaram que a cultivar Smith-5, que é resistente a *Phytophthora capsici*, acumulou mais lignina que a cultivar susceptível Wonder. Dubery e Slater (1997) verificaram que um elicitor da parede de *Verticillium dahliae* elicou o acúmulo de lignina em discos foliares de plantas de algodão.

Outros compostos fenólicos muito estudados são as fitoalexinas, que apresentam baixo peso molecular e são produzidas pelas plantas em resposta a infecção ou estresse (HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997), sendo sintetizadas pelo metabolismo secundário das plantas (HAMMERSCHMIDT, 2003). Ademais, dentre as diferentes respostas de defesa, a síntese desses compostos normalmente é o último evento (HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997), a qual pode ser ativada por elicitores exógenos, ou seja, produzidos pelos patógenos, ou elicitores endógenos, que são produzidos pelas plantas em resposta a uma situação de estresse (SEKI et al., 1999). Apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, mais de 400, porém todas são lipofílicas, o que permite atravessar o plasmalema, além de interferir no funcionamento normal das membranas

como no aumento da perda de eletrólitos (SMITH, 1996). Apesar dessa diversidade, as fitoalexinas são sintetizadas através de três rotas metabólicas: acetato-malonato, acetato-shiquimato e acetato-mevalonato (HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997).

Bonaldo (2005) verificou que extratos autoclavados de levedura elicitaram o acúmulo de fitoalexinas em plantas e em mesocótilos de sorgo inoculados com *Colletotrichum sublineolum*. Além disso, as plantas de sorgo apresentaram menor severidade de antracnose tanto local quanto sistemicamente. Thomma et al. (1999) verificaram que plantas de *Arabidopsis* deficientes na produção na fitoalexina camalexina, foram mais susceptíveis à *Alternaria brassicicola* do que as plantas que produziam esse composto. Por outro lado, esse mutantes não foram mais susceptíveis a *B. cinerea*.

2.1.4 Tobacco mosaic virus (TMV)

O TMV possui grande importância histórica na fitopatologia mundial. Em 1885, Mayer, pesquisador alemão, estudando a causa do mosaico em plantações de fumo dos Países Baixos, testou diversas hipóteses como, a deficiência nutricional, falta ou excesso de umidade, temperaturas extremas, porém as mesmas não eram responsáveis pelo desenvolvimento de mosaico em fumo. Paralelamente, esse pesquisador verificou que o suco de tecido de planta de fumo doente era capaz de infectar uma planta sadia e essa infectividade era perdida quando o extrato era aquecido a 80°C por várias horas, além de que as sementes de plantas doentes geravam plantas sadias e o agente causal não era veiculado pelo solo. A esse desconhecido patógeno, Mayer chamou de fluido vivo contagioso. Posteriormente, em 1892, Ivanowski verificou que o agente causal do mosaico do fumo era capaz de passar através de filtro de porcelana. Em vista dos conhecimentos científicos da época, para o pesquisador, a causa do mosaico poderia ser uma toxina produzida por alguma bactéria. Já Beijerinck, em 1898, confirmou os resultados de Mayer e Ivanowski e, além disso, verificou que o agente causal era capaz de difundir em gel de agarose e o chamou de vírus. Finalmente, em 1935, Stanley isolou uma estrutura cristalina protéica com as propriedades do TMV.

O vírus do mosaico do fumo encontra-se amplamente distribuído nas regiões onde esta planta é cultivada. Individualmente, as plantas infectadas por este fitopatógeno, apresentam redução na produção de até 15%, porém a alta incidência do mesmo, faz com que esta seja uma das principais doenças da cultura (SHEW; LUCAS, 1990). Este

retrovírus, ou seja, vírus com ácido nucléico tipo RNA, pertence ao grupo *Tobamovirus*, com dimensões de 18 nm x 300 nm e é composto por uma capa protéica com aproximadamente 2130 subunidades idênticas e por apenas uma fita de ácido nucléico (CULVER, 2002).

Os sintomas causados pelo vírus nas plantas podem ser observados em todos os estádios de desenvolvimento. Geralmente, causam redução da área foliar, rugosidades e má formação das folhas, que se apresentam mais afiladas e espessas. No limbo foliar, observa-se a presença de mosaico.

A movimentação do vírus na planta pode ser por dois mecanismos. O primeiro mecanismo é o movimento célula a célula, o que ocorre através dos plasmodesmas. Para isso, o RNA do vírus forma um complexo com a proteína 30 K, e o conjunto é transportado para o plasmodesma, o qual tem o limite de exclusão aumentado, o que permite a passagem da proteína e do RNA viral (CARRINGTON et al., 1996). O segundo mecanismo é a movimentação sistêmica do vírus, a qual ocorre no floema das plantas inoculadas, (CHENG, 2000), e para esse movimento, o ácido nucléico viral deve estar encapsulado (CARRINGTON et al., 1996).

O papel da capa protéica desse *Tobamovirus* na elicitação de várias respostas de resistência gene-específica tem sido caracterizada. Várias evidências levam a conclusão de que a capa proteica é o ativador da resposta de hipersensibilidade conferida pelo gene N (CULVER, 2002).

2.1.5 Cianobactérias e algas eucarióticas

2.1.5.1 Aspéctos gerais

2.1.5.1.1 Cianobactérias

As cianobactérias (algas verdes-azuis), juntamente com as algas eucarióticas, compreendem a maior parte da biomassa do mundo (PELCZAR et al., 1996). Sua ocorrência abrange um espectro ambiental muito variado envolvendo solos, água doce e salgada, áreas onde a temperatura é muito alta (superior a 60°C) e/ou extremamente áridas (que não comporta o desenvolvimento de outros grupos biológicos). Essa

versatilidade é devido em grande parte a capacidade que as cianobactérias exibem de fixar nitrogênio e realizar fotossíntese (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977).

As principais características das cianobactérias, segundo Pelczar (1996), são ausência da membrana nuclear, de cloroplastos limitados por membrana, de retículo endoplasmático, de mitocôndrias e de complexo de Golgi; e se reproduzem por fissão binária. Além disso, apresentam sensibilidade a infecções virais, morfologia semelhante a bactérias e formas bastante variadas, como cocos, bastonetes ou filamentos longos; são uni ou multicelulares; não possuem flagelos.

A parede celular das cianobactérias apresenta peptídeoglicano, o qual corresponde a 50% do peso seco da parede celular. O mucopolímero da parede celular é composto de 5 unidades básicas típicas, das quais 2 são amino-açúcares (ácido murâmico e glucosamina) e 3 são aminoácidos (ácido diaminopimélico, ácido glutâmico e alanina) (Weise et al., 1970).

Algumas cianobactérias podem fixar nitrogênio através de células anaeróbicas denominadas heterocisto. Nos países do continente asiático, as cianofíceas representam a principal maneira de manutenção desse nutriente no solo. Quando os campos daquele continente estão alagados, as cianobactérias fixam nitrogênio, por sua vez quando estão secos, esses microorganismos morrem e liberam o nitrogênio para o solo. A associação *Azolla* sp.-*Anabaena* sp. pode fixar 0,5 kg de nitrogênio/hectare/dia, suficiente para manter uma lavoura de arroz (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.1.5.1.2 Algas eucarióticas

Visto que 75% do planeta Terra é coberto de água, estima-se que 80% do O₂ existente seja produzido por algas (TORTORA et al., 2000). As algas são fotoautotróficas, porém algumas podem crescer de maneira heterotrófica. Já que todas as células das algas fazem fotossíntese e são capazes de absorver nutrientes, as mesmas não precisam de sistemas de vasos (Pelczar et al., 1996). As algas eucarióticas podem ser unicelulares ou multicelulares. O corpo é formado por um talo, que fixa a alga em um suporte, uma estrutura caulinífome, que não é lignificada ou lenhosa e por lâminas que se assemelham a folhas (TORTORA et al., 2000). Segundo Pelczar et al. (1996) as algas podem ser classificadas de acordo com sua pigmentação, habitat, morfologia, fonte de reserva de energia e composição da parede celular.

De maneira diferente das cianobactérias, a parede celular das algas eucarióticas é composta principalmente por celulose. Além desse polissacarídeo, elas podem conter pectina, ácido algínicos e sílica. Também são encontradas algas onde a parede celular está ausente (Pelczar et al., 1996). Elas contribuem para a formação e integridades dos solos, além de constituir comunidade pioneira em substratos recentemente expostos à biosfera, como depósitos vulcânicos. Essa característica é devido à ação de polissacarídeos extracelulares produzidos pelas algas que liberam os nutrientes insolúveis dos substratos, além da capacidade de fixar nitrogênio (METTING, 1981).

2.1.5.2 Propriedades farmacológicas de cianobactérias e de algas

Burja (2001) cita que diferentes espécies de *Nostoc* são utilizadas no tratamento de artrite, úlcera e várias formas de câncer desde 1500 a.C., além disso, elas podem ser indicadas como suplemento alimentar, como *Nitzschia frustula* ou *Nostoc flagelliforme* que além de crescerem rápido, apresentam boas qualidades nutricionais e trazem benefícios a saúde (RAO; PAN; AL-YAMANI, 2005; TAKENAKA et al., 1998).

Dois compostos foram isolados, calothrixina A e B, de *Calothrix* sp., os quais apresentaram atividade *in vitro* sobre células cancerígenas humanas e sobre *Plamodium falciparum*, agente causal da malária (RICHARDS et al., 1999). Ademais, mutantes sem parede celular de *Chlamydomonas reinhardtii* apresentaram atividade anticancerígena em células de ratos (MAUCOURT et al., 2002). Por outro lado, diferentes preparações de algas ou cianobactérias apresentam efeito direto sobre diversos vírus, como o vírus de gripe A, *Avian myelblatosis virus* (AMV), *Herpes simplex virus* (HSV), *Human immunodeficiency virus* (HIV) (ZAINUDDIN et al., 2002; HAYASHI; HAYASHI; MORITA, 1992; LAU et al., 1993, HULEIHEL; et al., 2001), bactérias, como, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (XU et al., 2003, OSTENSVIK et al., 1998); e fungos, como *Candida albicans* (MILLIGAN et al., 2000); causadores de enfermidades em seres humanos. Uma vacina desenvolvida a base de uma β -glucana isolada da alga *Laminaria digitata* evitou que ratos fossem infectados por *Candida albicans* (TOROSANTUCCI et al., 2005)

2.1.5.3 Efeito de cianobactérias e de algas sobre animais

Soares; Magalhães e Azevedo (2004) verificaram o acúmulo de microcistina, um grupo de toxinas compostas por sete peptídeos, isolada de esporos de *Microcystis aeruginosa*, no fígado e no músculo de *Tilapia rendalli*. Não menos importante, toxinas produzidas por cianobactérias ou algas podem afetar a saúde de outros animais aquáticos, como salmão, truta, anfíbios, invertebrados aquáticos e ciliados (ANDERSEN et al., 1993; KANKAANPÄÄ et al., 2002; BROENMARK; MINER, 1992; SMITH; VAN BUSKIRI, 1995; HAVEL, 1990; FYDA; WIACKOSK, 1998; JULLIARD et al., 2001). A morte de peixes e de gado na Austrália esta relacionado com a esporulação de varias espécies de algas (HALLEGRAEFF, 1992). Por sua vez, Rao et al. (1998) verificaram que microcistina provoca a fragmentação de DNA em ratos vivos. Nogle e Gerwick (2002) verificaram que somocistinamida A (1) é tóxica a ratos e apresentou $IC_{50} = 1,4\mu\text{g/ml}$. Em outro estudo que envolveu essa toxina, Delaney e Wilkins (1995) verificaram que a mesma foi mais eficiente no controle de traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*), mosca (*Musca domestica*) e lagarta-militar (*Spodoptera littorais*) do que os inseticidas usados como controles.

2.1.5.4 Efeito de cianobactérias e de algas sobre o homem

A presença de toxinas produzidas por cianobactérias em água está recebendo mais atenção da comunidade científica mundial (LAMBERT; HOLMES; HRUDEY, 1994; FALCONER, 1999), a fim de se evitar casos como aqueles que ocorreram na China, onde a água para o consumo estava contaminada com microcistina, o que provocou o desenvolvimento de uma epidemia de câncer naquele país (WU et al., 1999), ou no Brasil, em Caruaru, onde 89% dos pacientes que freqüentaram o centro de hemodiálises “A” em fevereiro de 1996 morreram, e os sobreviventes apresentaram distúrbios visuais, náuseas e vômitos. Porém, os pacientes que freqüentaram o centro de hemodiálises “B” não tiveram esses problemas. Após a análise da água, foi detectado a presença de microcistina apenas na água do centro de hemodiálises “A”, pois a água desse centro não era filtrada e clorada, enquanto a do centro “B” recebia esses tratamentos (JOCHIMSEN et al., 1998). Ademais, de acordo com Soares; Magalhães e Azevedo (2004), 82% das cianobactérias, isoladas de água doce em diferentes ecossistemas no Brasil, produzem alguma substância

tóxica, o que pode representar um risco para o consumo de alimentos oriundos de ambientes aquáticos.

As cianobactérias não causam problemas apenas na qualidade da água. Em Guam, Ilhas Maurício, uma espécie de *Nostoc* vive em simbiose com árvores do gênero *Cica*. Todavia, essa cianobactéria produz β metilamino-L-alanina, o qual é absorvido pelas plantas, translocado e armazenado nos frutos. Os “flying fox”, ou seja, morcegos gigantes, se alimentam desses frutos contaminados, que posteriormente poderão ser capturados e preparados em um prato típico da população daquela ilha. Ao se alimentarem da carne do morcego, as pessoas ingerem, conseqüentemente, o composto produzido pela cianobactéria, o que provoca alta taxa de indivíduos com distúrbios neurológicos e baixa expectativa de vida dos habitantes daquele local (COX; BABACK; MURCH, 2003).

2.1.5.5 Efeito de cianobactérias e de algas sobre fitopatógenos

Alguns fungos de interesse para os fitopatologistas, como os saprófitas *Chaetomium globosum*, *Cunninghamella blakesleeana* e *Aspergillus oryzae* (DE MULÉ et al., 1977; MATUSIAK; KRZYWICKA, 1975), bem como os fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum* (DE CAIRE et al., 1987) podem ser inibidos *in vitro* por diferentes cianobactérias. Alguns trabalhos também relatam a capacidade de extratos de algas marinhas, quando aspergidos sobre plantas reduziram a incidência de *B. cinerea* em morangos, *Erysiphe polygoni* em nabo e “damping-off” em plântulas de tomate (ABETZ; YOUNG, 1983; STEPHENSON, 1966).

De acordo com Kulik (1995), visto que muitas cianobactérias e algas produzem uma grande quantidade de compostos antibacterianos e antifúngicos e poderem ser cultivadas em larga escala, as mesmas mostram-se adequadas como candidatas para uso como possíveis agentes controladores de fitopatógenos. Nesse sentido, o referido autor escreveu o artigo “The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi”, estimulando estudos visando o uso de cianobactérias, como possíveis agentes biológicos de controle de fitopatógenos e elicitores de resistência em plantas. Assim, Di Piero (1999) demonstrou que filtrados de culturas e os conteúdos intracelulares das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. reduziram em pelo menos 50% a quantidade de lesões provocadas pelo TMV em plantas de fumo, cultivar TNN.

Pandey e Pandey (2002) verificaram que extratos etanólicos de *Lyngbya majuscula*, *Microcystis aeruginosa* e *Plectonema boryanum*, além de terem reduzido o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*, também reduziram o número de lesões provocadas por essa bactéria, em pimentão, em pelo menos 85%, na concentração de 500 mg.l⁻¹. Extratos metanólicos de várias espécies de *Laurencia* apresentaram efeito *in vitro* sobre *Erwinia amylovora* (Vairappan et al., 2001).

Além disso, Beltrame e Pascholati (2005) evidenciaram que suspensões de isolados de cianobactérias, bem como suas preparações reduziram a esporulação, local e sistêmica, de *Podosphaera xanthii* em plântulas de pepino. Os mesmos autores também verificaram que as suspensões de cianobactérias reduziram a germinação de conídios do patógeno.

Por outro lado, Pascholati et al. (1998) também constataram que o conteúdo intracelular de *Limnothrix planctonica* induziu o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Di Piero (1999) verificou que os preparados de *S. leopoliensis* elicitarão o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja. Finalmente, Rao, Sarada e Ravishankar (1996) constataram o acúmulo de capsaicina e anthocianina, elicidadas por *Spirulina platensis*, em culturas de células de *Capsicum frutescens* e *Daucus carota*. Esses resultados mostram que as cianobactérias podem agir diretamente sobre os patógenos ou ativar respostas de resistência latentes das plantas.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Obtenção e manutenção das cianobactérias e algas eucarióticas

Os isolados de cianobactérias e de algas eucarióticas da coleção do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo, do Setor de Fitopatologia (ESALQ/USP), foram utilizados para a realização dos experimentos. Além disso, usou-se os isolados das cianobactérias *Nostoc* sp. 21 e *Nostoc* sp. 61, cedidos pela Dr.^a Marly F. Fiori (CENA/USP, Piracicaba, SP), bem como *Rhabdoglea brasílica*, fornecidos pela Dr.^a Maria T.P. Azevedo (Instituto de Botânica, SP). As cianobactérias e as algas eucarióticas serão chamadas de maneira genérica de algas.

O cultivo foi efetuado em frascos tipo erlenmeyer de 250 ml, os quais continham 100 ml de meio de cultivo BG 11 (Anexo 1). A repicagem, periódica, foi efetuada com a adição de uma alíquota de 1 ml de inóculo por recipiente. Os isolados foram mantidos a 28°C sob luz fluorescente constante.

Para verificar se os isolados utilizados eram de organismos eucariotos ou procariotos, os mesmos foram cultivados em meio de cultivo com 10µg/l de ciclohexamida, a qual inibe a síntese de proteínas de células de eucariotos.

2.2.2 Quantificação da clorofila *a* e do peso seco

A produção da biomassa foi monitorada, ao vigésimo dia de cultivo, com a quantificação da clorofila *a*, bem como da matéria seca, dos isolados que apresentaram efeito sobre o TMV. Para a quantificação da clorofila *a*, alíquotas de 1 ml das suspensões das algas foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em metanol 100%. Após 5 min, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min. Os sobrenadantes, nos quais estava a clorofila *a* extraída, foram avaliados em espectrofotômetro. A determinação da quantidade de clorofila *a* foi efetuada com o emprego da fórmula: $\mu\text{g de clorofila } a.\text{ml}^{-1} = \text{Absorbância (665 nm)}.12,5$ (Aguiar, 1992). Por sua vez, o peso seco foi quantificado com a filtragem de 10 ml de suspensão das algas em filtros GF/A, cujos pesos foram previamente determinados. Após, os filtros foram mantidos em estufa a 60°C por 48 h e foram novamente pesados. A

quantificação da matéria seca foi feita com base na diferença da segunda para a primeira pesagem.

2.2.3 Obtenção dos preparados das algas

A obtenção dos preparados de algas foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Di Piero (1999). Alíquotas de 75 ml de culturas das algas (com 20 dias de cultivo e mantidas a 28°C, sob luz fluorescente constante) foram filtradas a vácuo em papel de filtro GF/A, seguida de outra filtração a vácuo em membrana tipo Millipore (diâmetro de 0,2 µm), obtendo-se o "filtrado do meio de cultivo" (M). Por sua vez, as células retidas na filtração das culturas foram colocadas em almofariz e maceradas com pistilo, com a adição de nitrogênio líquido. O pó obtido foi ressuspenso em 10 ml de água destilada e as suspensões resultantes centrifugadas a 10.000 g por 10 min, seguida por filtração a vácuo do sobrenadante com o uso de membrana tipo Millipore, obtendo-se assim o "filtrado do conteúdo intracelular" (C).

2.2.4 Obtenção e manutenção das plantas hospedeiras

Sementes de fumo, cultivar TNN ou Turkish, obtidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo, do Setor de Fitopatologia (ESALQ/USP), foram semeadas em bandejas de isopor, contendo 128 células, preenchidas com substrato Plantmax (Hortaliças HA), da EUCATEX AGRO. As plântulas de fumo, com 20 dias após a semeadura, foram transplantadas para vasos de alumínio, com volume de 1840 cm³, que continham mistura autoclavada de terra, areia e matéria orgânica (3:1:1, respectivamente). Todo o cultivo foi realizado em casa-de-vegetação.

2.2.5 Obtenção e manutenção do TMV

O isolado do vírus, cedido pelo Prof. Dr. Robson M. Di Piero (UFSC, Florianópolis), foi inoculado mecanicamente em plantas saudáveis de fumo, cultivar Turkish, onde a colonização é sistêmica, com 40 dias de cultivo, obtidas de acordo com o 2.2.4. As mesmas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação. Após 25 dias da inoculação das plantas, as folhas que exibiam o sintoma típico causado pelo vírus (mosaico) foram

coletadas, pesadas, congeladas e a partir dessas feita a purificação parcial do vírus. Para isto, foram utilizadas 125 gramas do tecido foliar, que foi homogeneizado, com auxílio de liquidificador, em 250 ml de EDTA 0,003 M (pH 7,0) e 0,2 ml de 2-mercaptoetanol. O extrato obtido foi filtrado através de gaze, aquecido por 10 min a 55° C e centrifugado por 20 min a 1.500 g. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado por 2 h a 100.000 g. O precipitado foi ressuspenso em EDTA 0,003 M, pH 7,0 (1 ml/precipitado), acidificado a pH 5,2 com ácido cítrico 0,05 M e centrifugado a 12.000 g. O sobrenadante desta centrifugação teve o pH ajustado para 7,0 com NaOH 0,05 M e centrifugado por 1 h a 39.500 rpm em rotor 40. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1 ml de EDTA 3 mM, pH 7, completando assim a purificação parcial do vírus. A concentração do vírus foi calculada utilizando-se a fórmula: $c = \text{Abs} (260 \text{ nm})/e$, onde “c” é a concentração do vírus em mg.ml^{-1} e “e” o coeficiente de extinção do TMV, que equivale a 3,1 de absorvância para cada mg.ml^{-1} de vírus. Após sua quantificação, o vírus parcialmente purificado foi distribuído em tubos tipo eppendorf. Cada tubo recebeu uma alíquota de 100 μl e foi mantido a - 20°C.

2.2.6 Efeito da concentração do TMV no número de lesões em folhas de fumo

A fim de se determinar a melhor concentração de vírus para a inoculação das plantas de fumo, do cultivar TNN, onde a colonização é local, com 40 dias de cultivo, cultivadas como descrito no item 2.2.4, o vírus TMV foi inoculado, em 3 folhas intermediárias das plantas, nas concentrações de 0,2; 0,04; 0,02; 0,01; 0,002 e 0,0004 mg de vírus. ml^{-1} de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação. Cada concentração foi composta por 4 repetições. Após 5 dias, foi efetuada a contagem do número de lesões.

2.2.7 Efeito local de suspensões das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, cultivadas como descrito no item 3.3, receberam os tratamentos, pincelando-se 3 folhas intermediárias, com as suspensões de algas (20 dias após a repicagem, mantidas a 28°C sob luz fluorescente constante). O meio de cultivo BG 11, além de água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM) (50 i.a. mg.ml^{-1}), foram usados como controle. Após 2 dias, as folhas previamente tratadas

foram inoculadas com TMV ($0,02 \text{ mg de vírus.ml}^{-1}$ de tampão fosfato de potássio $0,02 \text{ M}$, pH 7) mecanicamente. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. Após 5 dias, efetuou-se a avaliação, com a contagem do número das lesões. A análise estatística foi efetuada com o uso do teste de Tukey 5%.

2.2.8 Efeito local e sistêmico de suspensão das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de crescimento, cultivadas como descrito no item 2.2.4, foram tratadas, pincelando-se meia-folha intermediária, com as algas Isolado 004/02, Isolado 008/02, Isolado 061/02, Isolado 090/02, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21 ou *Nostoc* sp. 61 (20 dias após a repicagem, mantidas a 28°C , sob luz fluorescente constante), além dos controles ASM (50 mg.ml^{-1} i.a.), água destilada ou meio de cultura BG 11. A outra meia-folha, bem como a folha imediatamente superior e a inferior à tratada com as suspensões das algas, foram tratadas com água destilada (Figura 1). Após 2 dias, as 3 folhas tratadas foram inoculadas mecanicamente com TMV ($0,02 \text{ mg de vírus.ml}^{-1}$ de tampão fosfato de potássio $0,02 \text{ M}$, pH 7). A avaliação foi realizada 5 dias após a inoculação do fitopatógeno. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. A análise estatística foi efetuada com o uso do teste de Tukey 5%. O experimento foi repetido duas vezes.

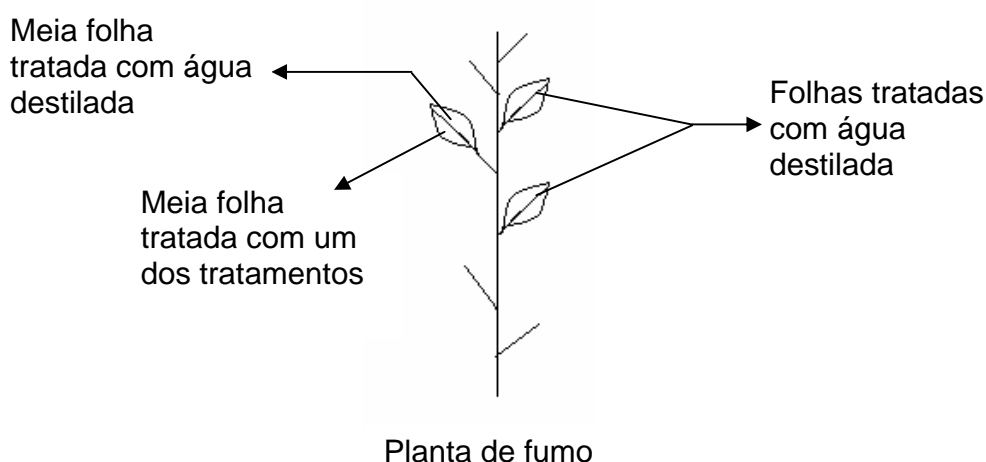


Figura 1 - Esquema utilizado para os testes de verificação dos efeitos local e sistêmico das algas no controle de TMV em plantas de fumo, cultivar TNN

2.2.9 Efeito das preparações das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de crescimento, cultivadas como descrito no item 2.2.4, foram tratadas, pincelando-se meia-folha intermediária, com as preparações das algas Isolado 004/02, Isolado 008/02, Isolado 061/02, *Anabaena* sp., ou *Nostoc* sp. 61, obtidas como descrito no item 2.2.3, além dos controles meio de cultura BG 11, ASM (50 i. a. $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ou água destilada. A outra meia-folha, bem como a folha imediatamente superior e a inferior à tratada com as suspensões das algas, foram tratadas com água destilada (Figura 1). Após 2 dias, as 3 folhas tratadas foram inoculadas mecanicamente com TMV (0,02 mg de vírus. ml^{-1} de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7). A avaliação foi realizada 5 dias após a inoculação do vírus. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. A análise estatística efetuada com o uso do teste de Tukey 5%. O experimento foi repetido duas vezes.

2.2.10 Efeito inibitório das algas sobre o TMV

Suspensões dos isolados 004/02, 008/02, 061/02, 090/02, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21 e *Nostoc* sp. 61, além dos controles água destilada, meio de cultivo BG 11 e ASM (50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ i.a.) foram misturadas com suspensão viral (0,04 mg de vírus. ml^{-1} de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7) (1:1 v/v). A seguir, plantas de fumo, com 40 dias de cultivo, cultivadas como descrito no item 2.2.4, foram inoculadas, mecanicamente, em uma folha intermediária com um dos tratamentos. A avaliação foi realizada 5 dias após a inoculação. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. A análise estatística efetuada com o uso do teste de Tukey 5%. O experimento foi repetido duas vezes.

2.2.11 Obtenção das amostras para a realização dos testes bioquímicos

Plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de crescimento, cultivadas como descrito no item 2.2.4, foram tratadas, pincelando-se meia-folha intermediária, com os Isolado 008/02 ou Isolado 061/02 (20 dias após a repicagem, mantidas a 28°C, sob luz fluorescente constante) ou com as preparações 4C ou 61 M, obtidas como descrito no item

2.2.3, além dos controles ASM (50 i. a. mg.ml⁻¹), água destilada ou meio de cultura BG 11. A outra meia-folha, bem como a folha imediatamente inferior à tratada com as suspensões das algas ou controles, foram tratadas com água destilada (Figura 1). Após 2 dias, as folhas previamente tratadas foram inoculadas, mecanicamente, com TMV (0,02 mg de vírus.ml⁻¹ de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7) ou apenas com o tampão fosfato de potássio.

Amostras de 0,5 g de discos foliares (2,1 cm Ø) foram coletadas e congeladas a -20°C. Os tempos de amostragem foram 0, 1, 2, 3, 4 e 6 dias após o tratamento das plantas. As análises bioquímicas foram realizadas duas vezes. Na primeira análise, cada tratamento foi composto por duas repetições. Já no segundo ensaio, cada tratamento foi composto por 3 repetições.

2.2.12 Ensaio enzimático para a determinação da atividade de β -1,3-glucanase

A determinação da atividade de β -1,3-glucanase foi realizada de acordo com Kombrink e Hahlbrock (1986). Para isso, as amostras, obtidas como descrito no item 2.2.11, foram maceradas, a baixa temperatura, em almofariz com auxílio de pistilo, homogeneizadas em 4,0 ml do tampão de extração (tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0) e centrifugadas a 20.000 g por 25 min. Os sobrenadantes foram recolhidos para a condução das análises. Em seguida, alíquotas de 150 μ l dos extratos, receberam 150 μ l de laminarina 0,2%, dissolvida no tampão de extração, antes (1) (glucanases hidrolisam laminarina liberando glicose) ou após (2) (glucanases não hidrolisam laminarina) o aquecimento a 37°C por 1h. Após, alíquotas de 10 μ l das misturas de reação previamente aquecidas receberam 1,5 ml de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) (1g dissolvido em 20 ml HCl 0,5 M e, após, adicionado 80 ml NaOH 0,5 M) e então incubadas em banho-maria a 100°C por 10 min. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm e a absorbância da glicose liberada pela laminarina foi obtida com base na subtração : (1) - (2). Os resultados expressos em μ g de glicose/min/mg de proteína. A curva padrão de glicose foi elaborada de acordo com Lever (1972), utilizando-se soluções de 30, 60, 90 e 120 μ g de glicose (Apêndice A). O teor total de proteínas foi determinado de acordo com Bradford (1976) (Apêndice B). A análise estatística foi

efetuada, com a comparação dos tratamentos em um mesmo tempo de amostragem, usando-se o teste de Tukey 5%.

2.2.13 Ensaio enzimático para a determinação da atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases nas amostras foi determinada espectrofotometricamente a 470 nm em uma mistura de reação que consistiu de 0,1 ml de extrato, obtido como descrito no item 2.2.12, e 2,9 ml do tampão de reação (100 ml tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6, 250 μ l guaiacol e 306 μ l peróxido de hidrogênio). A reação foi procedida por 1 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 6 s. Os resultados foram expressos em unidades de Densidade Óptica a 470 nm/ mg proteína/ min (DO/mg prot/min) (RONCATO e PASCHOLATI, 1998). O teor total de proteínas foi determinado de acordo com Bradford (1976) (Apêndice B). A análise estatística foi efetuada, comparando-se os tratamento em um mesmo tempo de amostragem, com o uso do teste de Tukey 5%.

2.2.14 Verificação do conteúdo total de fenóis

Para a extração de fenóis totais, amostras de 0,5 g, obtidas como descrito no item 2.2.11 foram homogeneizadas em metanol acidificado 80 % (80 ml de metanol + 0,1 ml HCl + 19,9 ml H₂O), centrifugadas a 12.000 g por 5 min e filtradas em papel de filtro Whatman nº 1. Após, o metanol foi evaporado a 40°C e o volume ajustado para 3 ml com água destilada. A seguir, a clorofila foi removida com a adição de 4,5 ml de hexana nas amostras e auxílio de pipeta Pasteur. Alíquotas de 150 μ l do extrato obtido receberam 3 ml de carbonato de sódio 2 % e, após 5 min, 150 μ l do reagente Folin-Ciocalteu 2 N sob agitação. A leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 750 nm após 30 min. A leitura da absorbância obtida foi substituída na curva padrão de fenóis, preparada com ácido clorogênico e os valores foram expressos em equivalente μ g de ácido clorogênico por grama de peso fresco (Eq. μ g ác. clor./ gpf). As concentrações de ácido clorogênico utilizadas na elaboração da curva foram de 0, 20, 50, 100, 150, 200 e 250 μ g/ml (BRAY; THORPE, 1954) (Apêndice C).

2.2.15 Verificação de espécies reativas de oxigênio

Visto que, 3,3-diaminobenzidina (DAB) polimeriza-se após entrar em contato com H_2O_2 e *nitroblue tetrazolium* (NBT) é reduzido na presença de O_2^- , pode-se detectar espécies reativas de oxigênio *in situ*, em tecidos vegetais, através de análises histológicas, com a observação do polímero castanho de DAB ou da coloração azul da forma reduzida de NBT. Em vista disso, a detecção de H_2O_2 e de O_2^- *in situ* foi realizada de acordo com Hüchelhoven et al. (2000) e Thordal-Christensen et al. (1997), respectivamente. Para isso, plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de crescimento, cultivadas como descrito no item 2.2.4, foram tratadas, pincelando-se meia-folha intermediária, com as suspensões dos isolados 008/02 ou 061/02 (20 dias após a repicagem, mantidas a 28°C, sob luz fluorescente constante) ou com as preparações 4C ou 61 M, obtidas como descrito no item 3.2, além dos controles ASM (50 mg.ml⁻¹ i.a.), água destilada ou meio de cultura BG 11. A outra meia-folha, bem como a folha imediatamente superior e a inferior à tratada com as suspensões das algas, foram tratadas com água destilada (Figura 1). Após 2 dias, as 3 folhas tratadas foram inoculadas mecanicamente com TMV (0,02 mg de vírus.ml⁻¹ de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7) sem o uso de abrasivo. Após 37 h, quando foi possível visualizar os primeiros sintomas, discos foliares com 2 cm Ø, que apresentavam sintomas típico de TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, foram coletados e sofreram infiltração a vácuo com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5, o qual continha DAB 1% ou NBT 0,1 % por 30 min. Em seguida, os discos foram incubados em luz fluorescente por 1 h. Para o clareamento dos discos, os mesmos foram mergulhados em etanol fervente por 15 min. Após, a oxidação do DAB e a polimerização do NBT foram verificadas com o auxílio de microscópio. O aumento utilizado foi de 40 vezes. O experimento foi repetido duas vezes.

2.3 Resultados

2.3.1 Distinção das algas procarióticas das eucarióticas

Os isolados 004/02, 063/02, 087/02, 088/02, 106/02, 118/02, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21, *Nostoc* sp. 61 e *Rhabdoglea brasílica* cresceram em meio de cultivo BG 11 que continha ciclohexamida (10 μ g/ml), mostrando que são cianobactérias. Por sua vez, os isolados 002/02, 008/02, 034/02, 042/02, 061/02, 062/02, 067/02, 072/02, 073/02, 075/02, 082/02, 083/02, 089/02, 090/02, 094/02, 095/02, 113/02 não cresceram, evidenciando serem algas eucarióticas.

2.3.2 Quantificação da clorofila a e do peso seco

A Figura 2 mostra que os isolados 004/02 e *Nostoc* sp. 21 apresentaram maior concentração de clorofila a, aproximadamente 12 μ g de clorofila a.ml⁻¹, bem como maior produção de peso seco, (18,5 e 14,5 μ g, respectivamente). Por sua vez, os isolados 008/02, 061/02, 090/02, *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp. 61 produziram entre 3 e 5 μ g de clorofila a.ml⁻¹ e matéria seca entre 6,5 e 8,8 μ g.

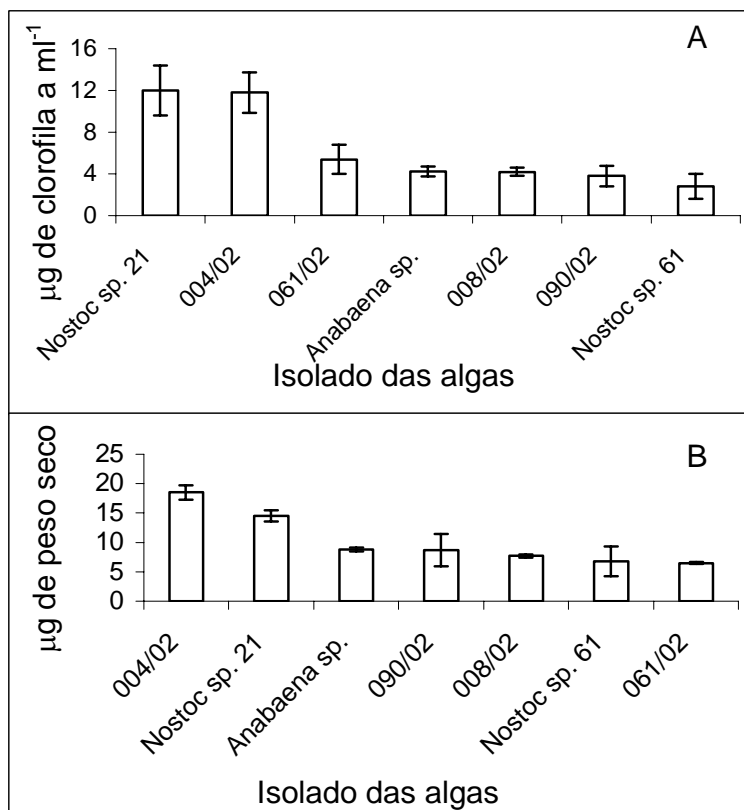


Figura 2 - Quantificação da clorofila a (A) e da peso seco (B) das algas que reduziram os sintomas de TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, mantidas sob condições de casa-de-vegetação

2.3.3 Efeito da concentração do vírus TMV no número de lesões em folhas de fumo

Foi verificado um aumento exponencial no número de lesões em função do aumento da concentração do vírus (Figura 3). Com esse resultado, pode-se definir que a melhor concentração viral para a realização dos testes era de 0,02 mg/ml. Pois, em altas concentrações de vírus as lesões coalescem, o que impede ou dificulta a contagem. Por sua vez, em baixas concentrações de vírus, forma-se um baixo número de lesões, o que pode mascarar os possíveis efeitos dos tratamentos.

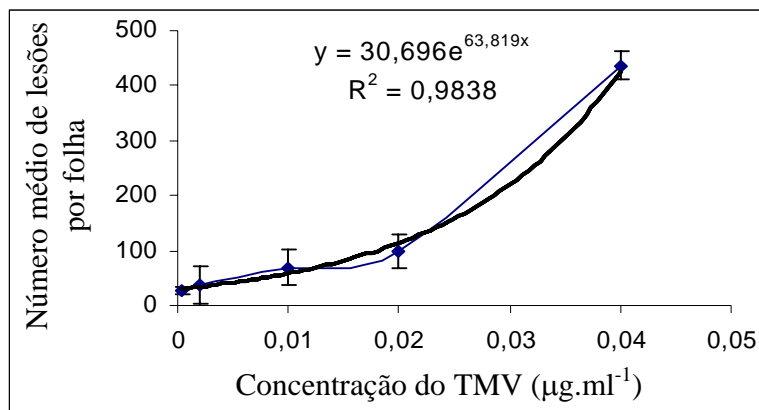


Figura 3 - Efeito da concentração do TMV no número de lesões em folhas de fumo

2.3.4 Efeito local de suspensões das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Como pode ser observado na Tabela 1, apenas os tratamentos Isolado 008/02, Isolado 061/02, Isolado 004/02, *Nostoc* sp. 61 e *Anabaena* sp. com 20 dias de cultivo, além do controle ASM (50 mg.ml⁻¹ i.a.) reduziram o número de lesões em folhas de fumo de plantas com 40 dias de cultivo, quando comparadas com o meio de cultivo das algas. Ademais, observou-se, também, redução no tamanho das lesões nas folhas de fumo em plantas tratadas com as mesmas algas, além dos isolados 090/02 e *Nostoc* sp. 21.

Tabela 1 - Influência das suspensões das algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação

Tratamentos	Número médio de lesões por folhas*
Isolado 094/02	170,7 ± 18,7 a
Isolado 063/02	153,5 ± 21,3 a
Isolado 072/02	149,7 ± 9,5 a
Isolado 088/02	147,5 ± 15,3 a b
Controle – água	144,7 ± 14,9 a b
Isolado 087/02	143,1 ± 31,1 a b
Isolado 095/02	141,9 ± 19,7 a b
Isolado 089/02	141,4 ± 16,9 a b
Isolado 002/02	140,7 ± 7,9 a b
Isolado 034/02	140,7 ± 5,2 a b
Isolado 082/02	140,5 ± 14,6 a b
Isolado 083/02	138,7 ± 25,3 a b
Isolado 073/02	138,7 ± 12,8 a b
<i>R. brasilica</i>	135,3 ± 24,2 a b
Isolado 113/02	133,6 ± 16,2 a b
Isolado 106/02	132,8 ± 10,5 a b
Isolado 118/02	115,8 ± 6,9 a b
Isolado 042/02	110,4 ± 3,5 a b
Controle – BG 11	106,3 ± 29,3 a b
Isolado 062/02	93,9 ± 17,5 a b c
Isolado 067/02	82,6 ± 23,9 b c
Isolado 075/02	91,0 ± 11,6 b c
<i>Nostoc</i> sp. 21**	78,6 ± 17,5 b c
Isolado 090/02 **	64,3 ± 14,6 b c
<i>Anabaena</i> sp.**	61,3 ± 15,5 c
Isolado 008/02**	46,0 ± 27,1 c
Isolado 061/02**	38,3 ± 8,9 c
Isolado 004/02**	35,0 ± 17,3 c
<i>Nostoc</i> sp. 61**	33,3 ± 14,5 c
Controle – ASM	9,3 ± 18,7 c

* Os dados representam a média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. ** Isolados que apresentaram diâmetro de lesões menores do que o controle BG11 (meio de cultivo). ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml⁻¹ i.a.)

2.3.5 Efeito local e sistêmico de suspensão das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Pode-se observar na Figura 4, que os isolados 004/02, 008/02, 061/02, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 61 apresentaram efeito local na redução no número de lesões em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação, o que confirmou os resultados obtidos no primeiro experimento. Por outro lado, os isolados 090/02 e *Nostoc* sp. 21 não promoveram redução no tamanho das lesões.

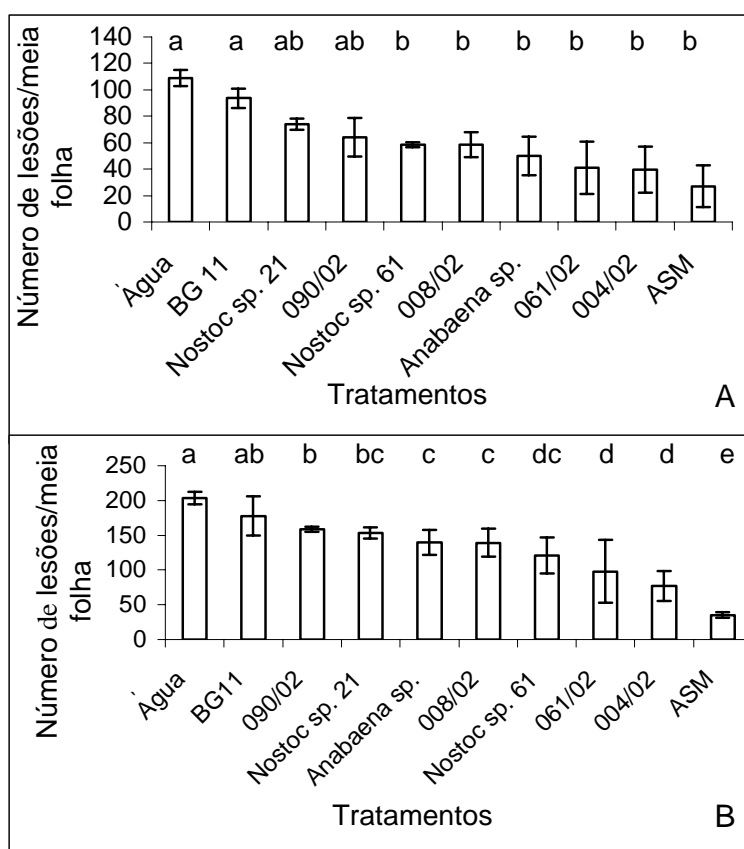


Figura 4 - Influência local das suspensões de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a)

Na Figura 5, pode-se observar que os isolados *Anabaena* sp., Isolado 004/02, Isolado 008/02, Isolado 061/02 e *Nostoc* sp. 61, com 20 dias de cultivo apresentaram efeito sistêmico na meia da folha tratada com água destilada em plantas de fumo, do cultivar

TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. Porém, a redução proporcionada pelo isolado *Nostoc* sp. 61 no primeiro ensaio, não se confirmou no segundo ensaio.

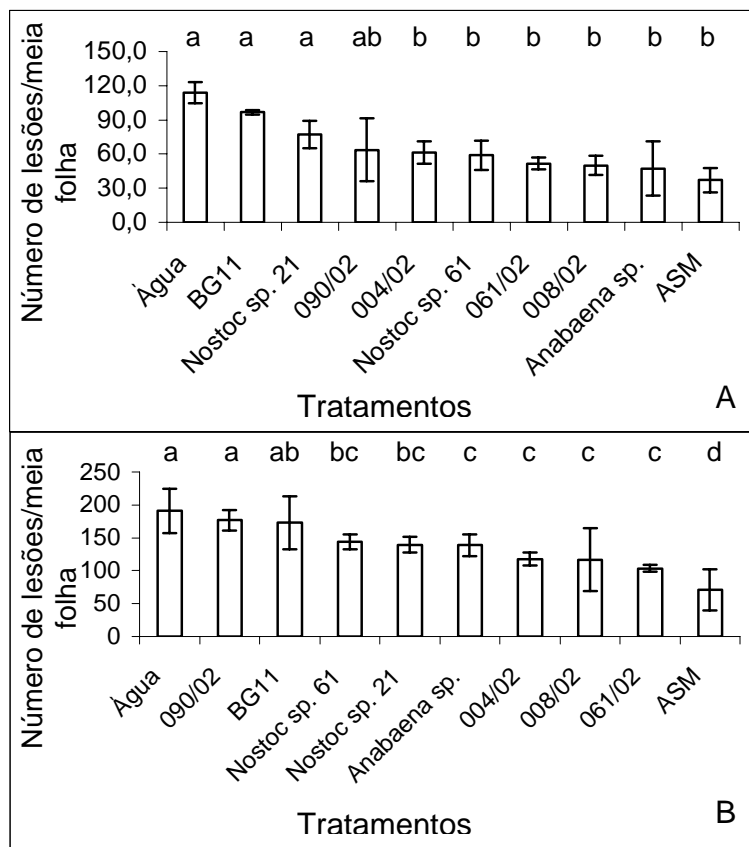


Figura 5 - Influência das suspensões dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente nas meia folhas tratadas com água destilada, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a)

Além disso, nenhuma suspensão de cianobactéria reduziu o número de lesões provocadas por TMV em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação, nas folhas superiores às tratadas (Figura 6).

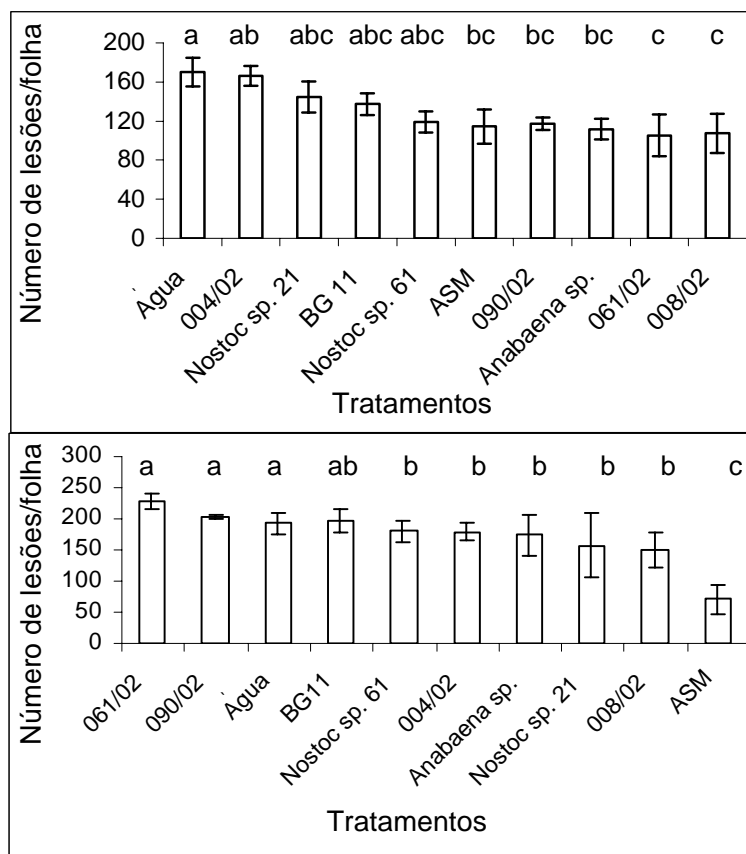


Figura 6 - Influência das suspensões dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente, nas folhas superiores às tratadas com suspensões de algas, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a)

Por fim, apenas as algas Isolado 008/02 e Isolado 061/02 (com 20 dias de cultivo) reduziram o número médio de lesões nas folhas inferiores às tratadas com suspensões de algas em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação (Figura 7). Entretanto, o Isolado 061/02 não reduziu a severidade do vírus no segundo experimento.

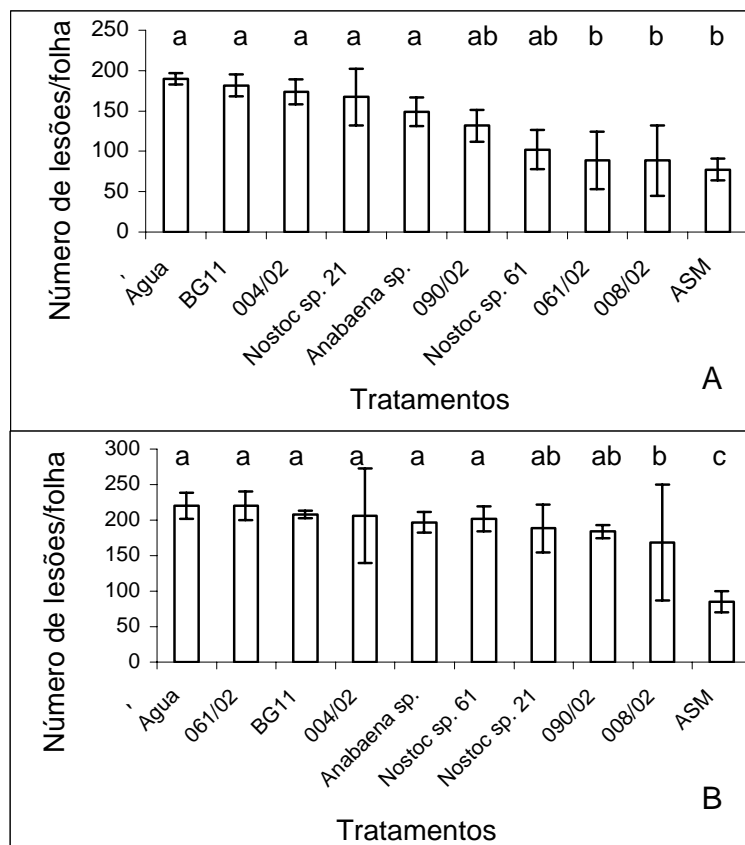


Figura 7 - Influência das suspensões dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente nas folhas inferiores às tratadas com as suspensões de algas, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a)

2.3.6 Efeito das preparações das algas na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo

Quando as plantas de fumo foram tratadas previamente com as preparações das algas, apenas os filtrados do meio de cultivo do Isolado 061/02 (61 M) e do conteúdo intracelular do isolado 004/02 (4 C) reduziram o número de lesões locais provocadas por TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, sob condições de casa-de-vegetação nos dois experimentos realizados (Figura 8).

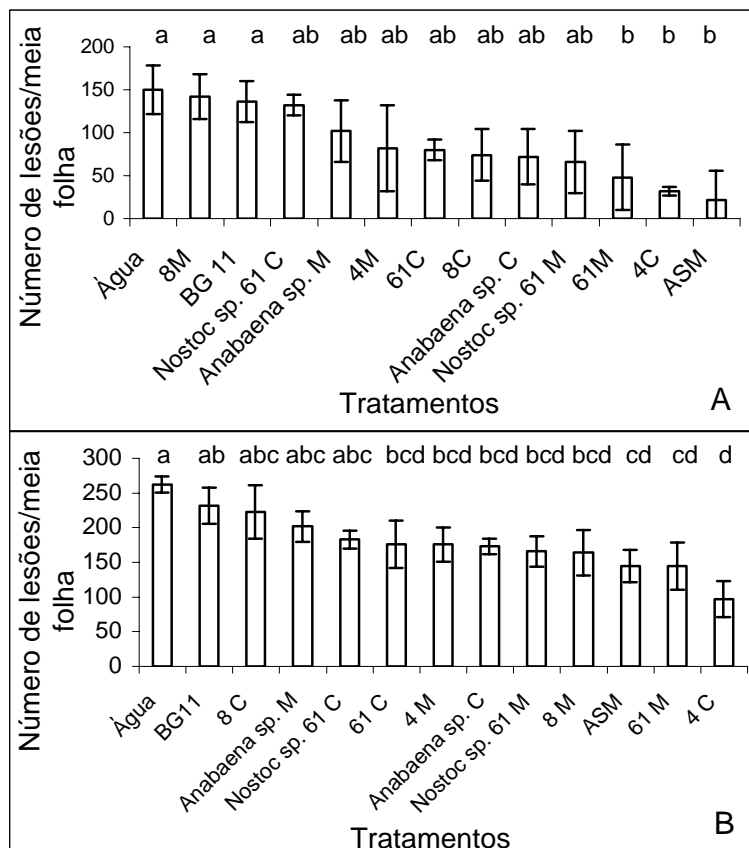


Figura 8 - Influência local das preparações de algas com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml⁻¹ i.a). C = preparação do conteúdo intracelular. M = filtrado do meio de cultivo

Porém, a Figura 9 mostra que, no primeiro teste, o tratamento 61 M reduziu o número de lesões provocadas por TMV nas meia folhas não tratadas, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. Já no segundo, o tratamento *Nostoc* sp. 61 M reduziu o número de lesões nas plantas. Todavia, nas duas repetições, ambos tratamentos apresentaram uma tendência de redução nos sintomas provocados pelo TMV em plantas de fumo, embora não seja observada diferença estatística.

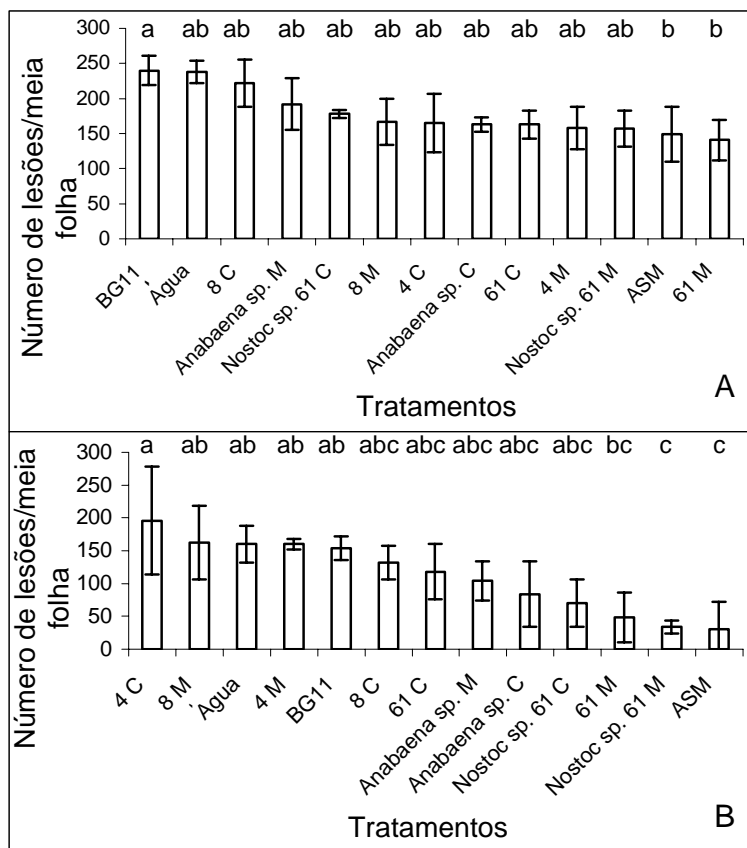


Figura 9 - Influência das preparações dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente nas meia folhas tratadas com água destilada, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml⁻¹ i.a). C = preparação do conteúdo intracelular. M = filtrado do meio de cultivo

Já nas folhas superiores e inferiores às tratadas, nenhuma preparação das algas reduziu o número de lesões provocadas por TMV, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação, nos dois ensaios realizados (Figuras 10 e 11).

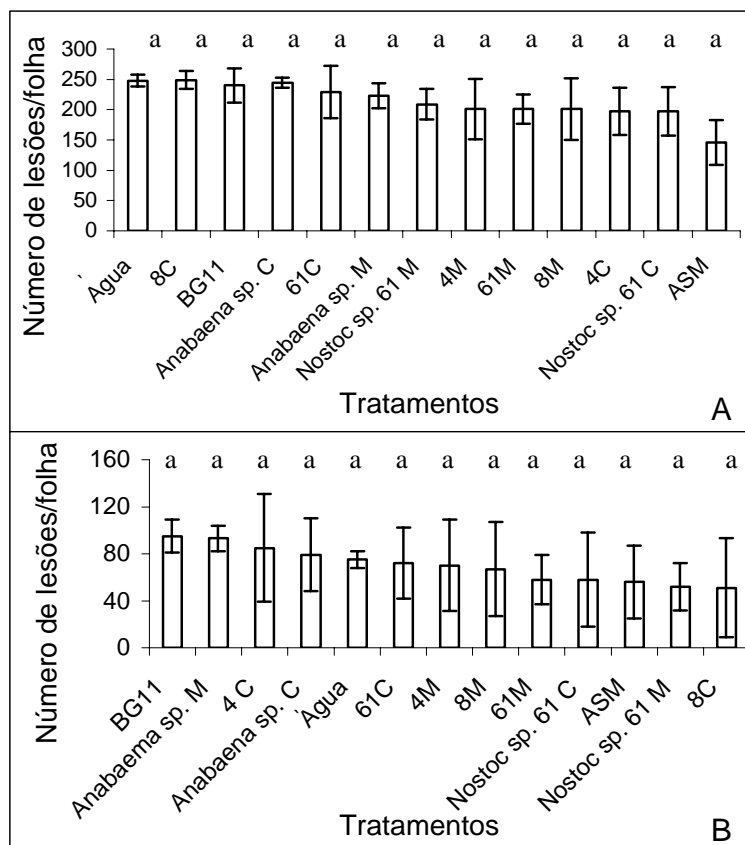


Figura 10 - Influência das preparações dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente nas folhas superiores às tratadas, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a). C = preparação do conteúdo intracelular. M = filtrado do meio de cultivo

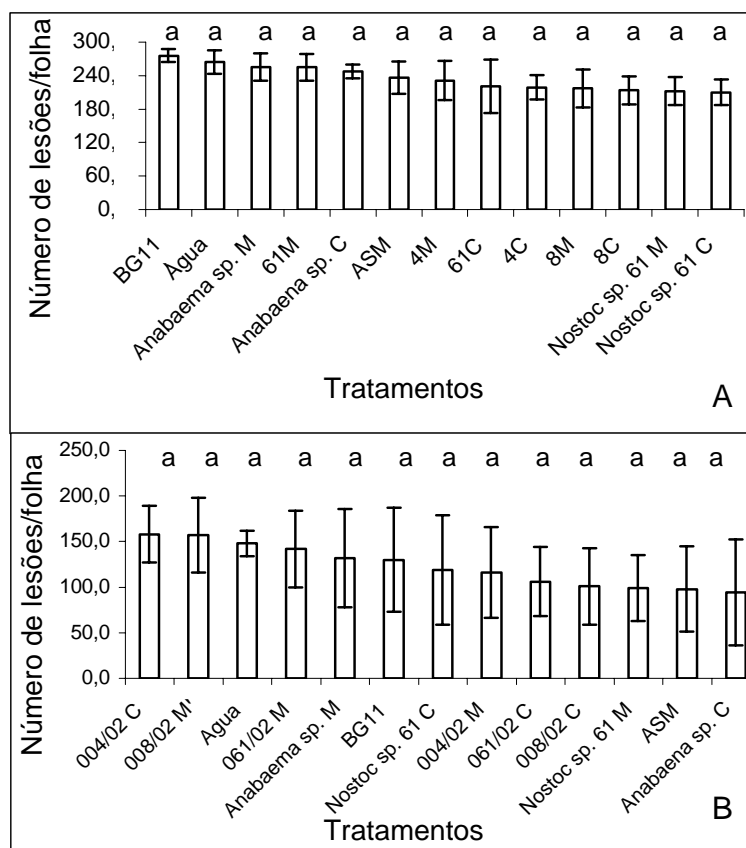


Figura 11 - Influência das preparações dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, na redução dos sintomas do TMV, inoculado mecanicamente nas folhas inferiores às tratadas, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml^{-1} i.a). C = preparação do conteúdo intracelular. M = filtrado do meio de cultivo

2.3.7 Efeito inibitório das algas sobre o TMV

Como pode ser visto na Figura 12, o número médio de lesões provocadas por TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação, ressuspensão com os isolados 090/02, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. 21, ou *Nostoc* sp. 61, foi menor que o número de lesões em plantas de fumo inoculadas com TMV ressuspensão com água destilada ou BG 11. No segundo experimento, a cianobactéria *Anabaena* sp., apesar de ter reduzido em 24 % o número de lesões em plantas de fumo, não deferiu estatisticamente dos tratamentos controles.

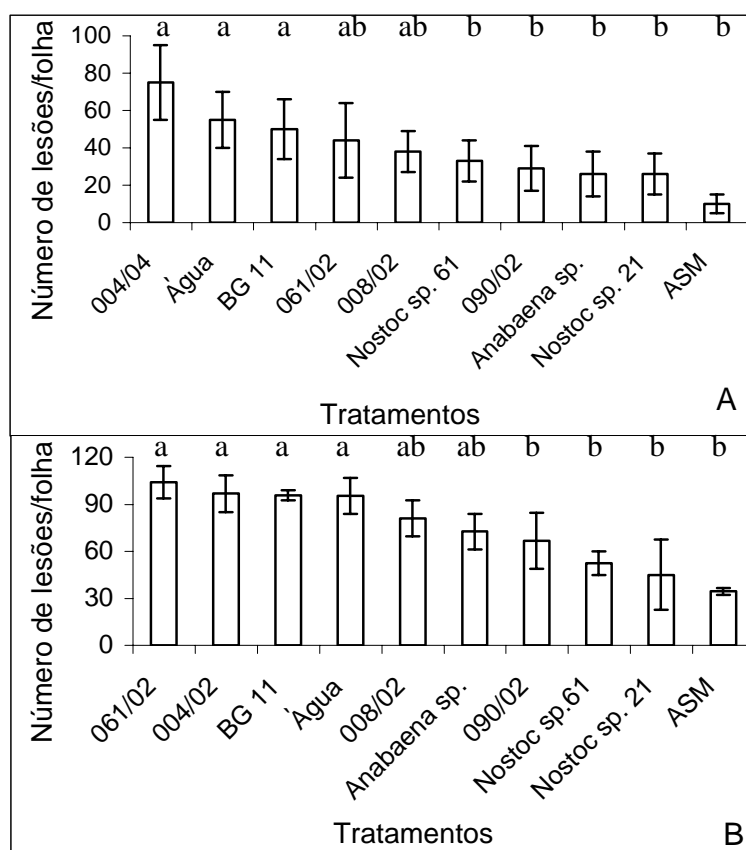


Figura 12 - Efeito inibitório dos isolados de algas, com 20 dias de cultivo, sobre o TMV, inoculado mecanicamente, em plantas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. A = primeiro teste realizado. B = segundo teste realizado. BG 11 = meio de cultivo. ASM = acibenzolar-S-metil (50 mg.ml⁻¹ i.a)

2.3.8 Ensaio enzimático para a determinação da atividade de β -1,3-glucanase

Foi constatado um incremento na atividade de β -1,3-glucanase nas folhas tratadas com ASM (50 mg.ml⁻¹ i.a) ou com o Isolado 008/02 um ou três dias após o tratamento, respectivamente (Figura 13). Porém, no segundo experimento, não foi observado aumento na atividade dessa proteína 3 dias após o tratamento das plantas com o Isolado 008/02. Quatro e seis dias após o tratamento, foi verificado um aumento na atividade dessa proteína nas plantas tratadas com os controles e inoculadas com o TMV.

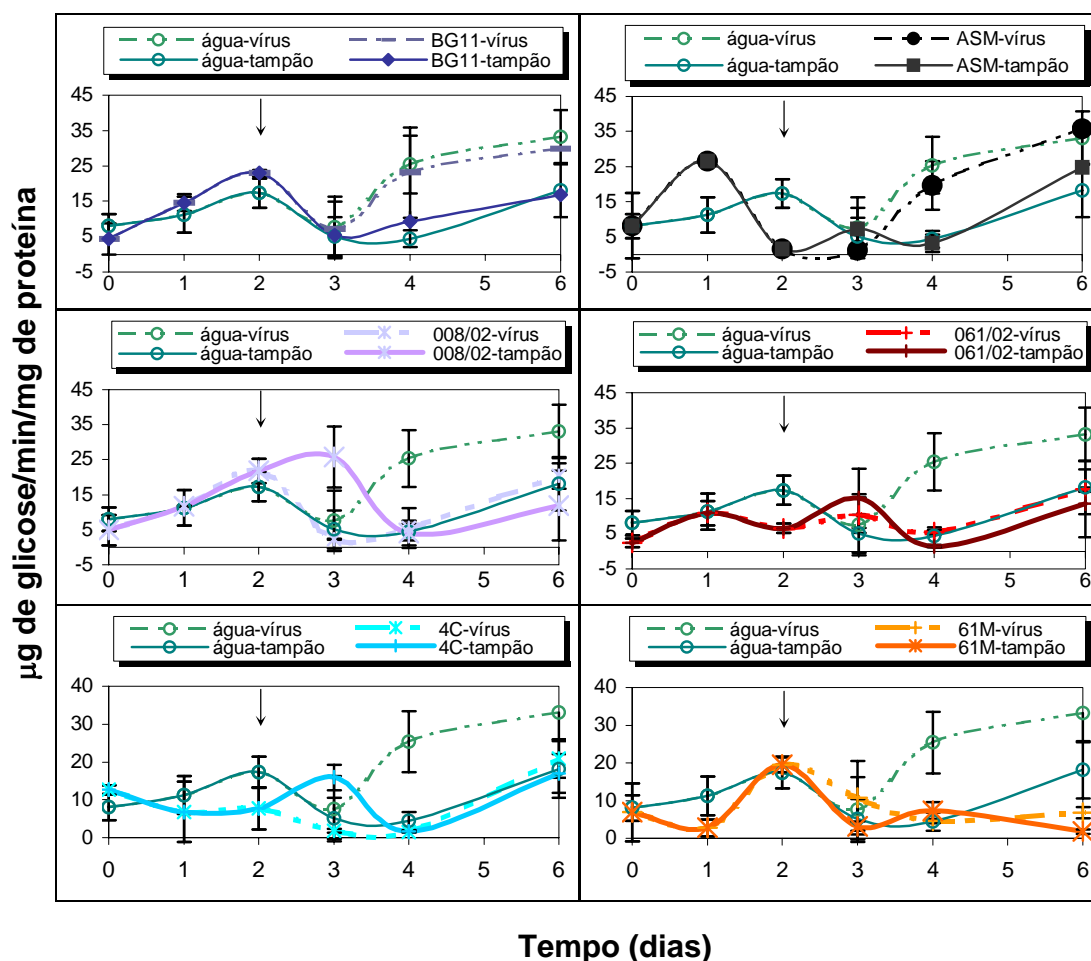


Figura 13 - Efeito local de preparações de algas sobre a atividade de β -1,3-glucanase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

Já nas meia folhas não tratadas, pode-se observar, um e dois dias após o tratamento das plantas, um incremento seguido por um decréscimo da atividade de β -1,3-glucanases nas plantas tratadas com ASM (50 mg.ml^{-1} i.a). Além disso, quatro e seis dias após o tratamento, foi verificado um aumento na atividade dessa proteína nas plantas tratadas com os controles e inoculadas com o TMV (Figura 14).

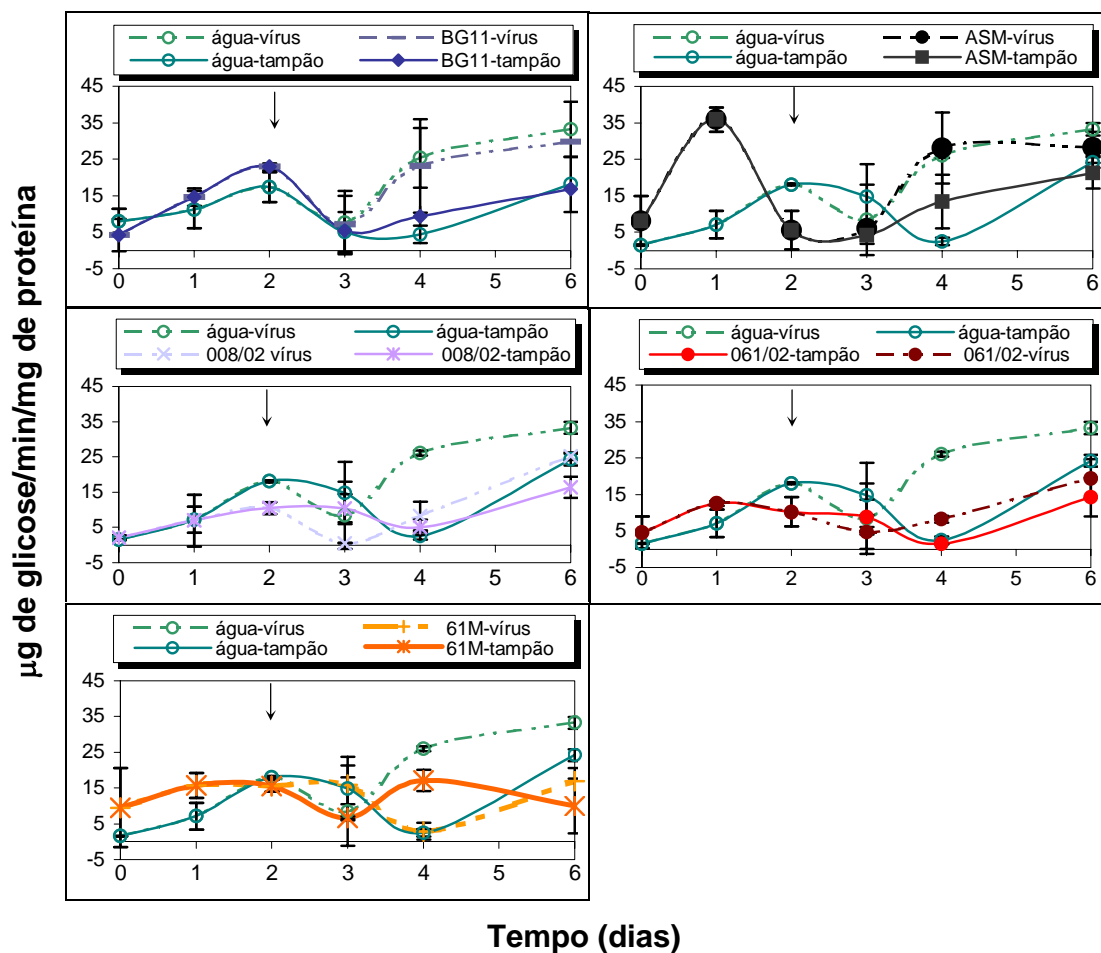


Figura 14 - Efeito nas meia folhas não tratada de suspensão ou de preparações de algas sobre a atividade de β -1,3-glucanase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

Por sua vez, folhas inferiores às tratadas de plantas tratadas com água destilada, meio de cultivo BG 11 ou ASM (50 mg.ml^{-1} i.a) e posterior inoculação com TMV apresentaram maior atividade de β -1,3-glucanase do que os outros tratamentos 4 e 6 dias após o tratamento (Figura 15).

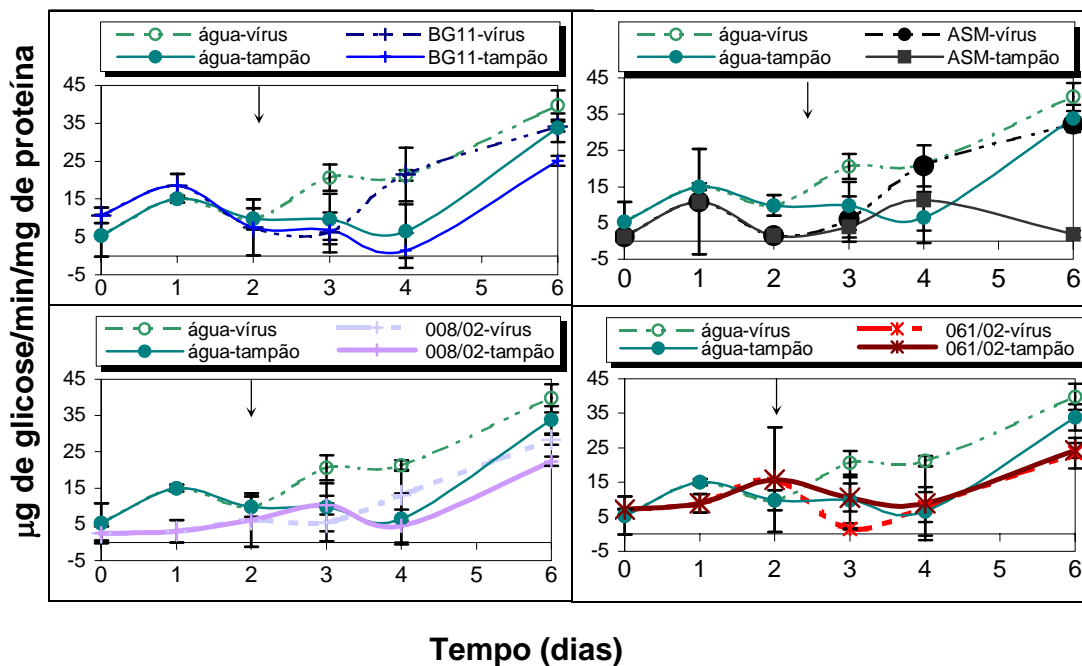


Figura 15 - Efeito nas folhas inferiores às tratadas com suspensões de algas sobre a atividade de β -1,3-glucanase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

2.3.9 Ensaio enzimático para a determinação da atividade de peroxidases

Plantas de fumo, cultivar TNN, tratadas com ASM ou com 4C, apresentaram maior atividade de peroxidases local, 2 ou 3 dias após o tratamento, respectivamente (Figura 16).

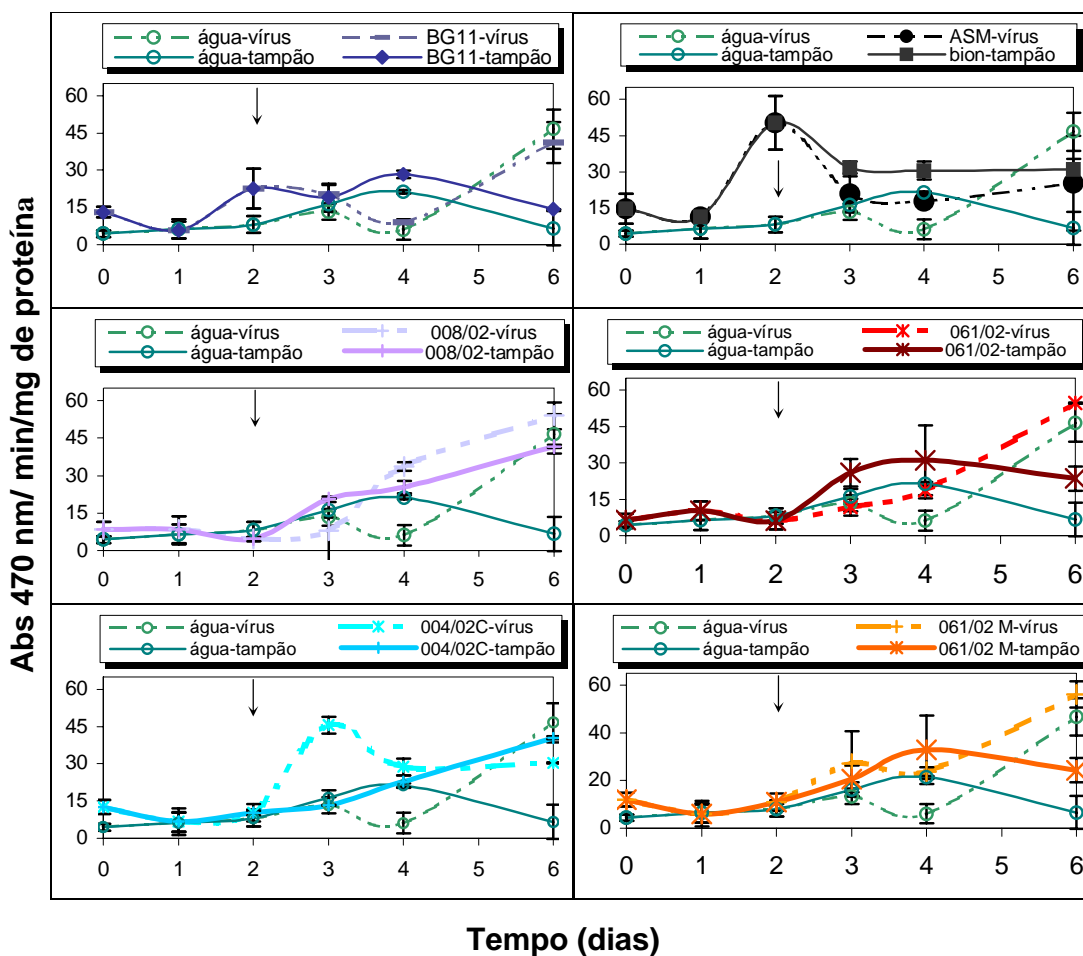


Figura 16 - Efeito local de preparações de algas sobre a atividade de peroxidase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

Na Figura 17, pode-se observar que não houve diferença na atividade de peroxidases, nas meia folhas não tratadas, entre as plantas tratadas com as algas e os controles. Seis dias após o tratamento, as plantas inoculadas com vírus apresentaram maior atividade dessa enzima do que as que receberam tampão mecânico.

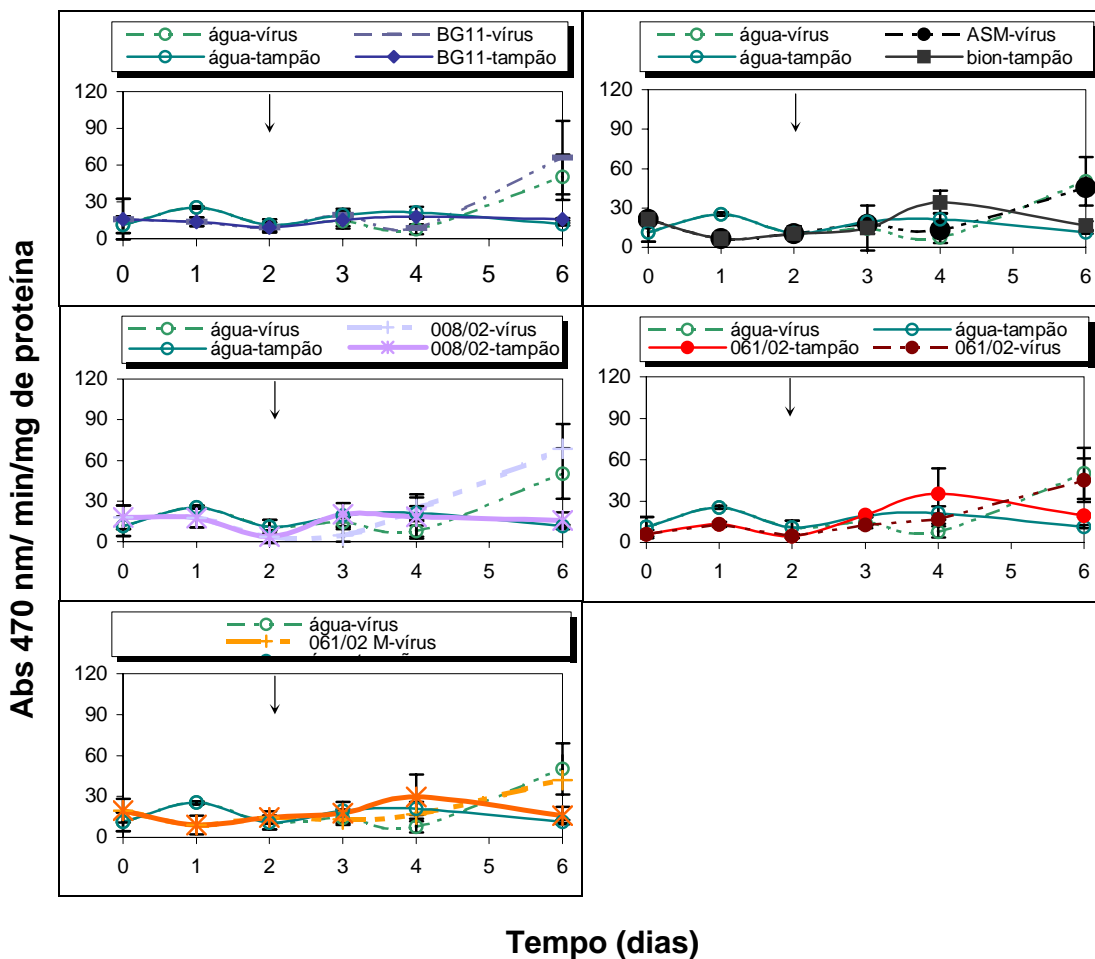


Figura 17 - Efeito nas meia folhas não tratadas de suspensão ou de preparações de algas sobre a atividade de peroxidase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

Finalmente, nas folhas inferiores às tratadas, o ASM (50 mg.ml^{-1} i.a) estimulou a atividade de peroxidases nas plantas de fumo, dois dias após o tratamento (Figura 18). Seis dias após o tratamento, observa-se que plantas inoculadas com vírus apresentaram maior atividade de peroxidases do que aquelas inoculadas com tampão. Nenhum tratamento envolvendo os isolados das algas estimulou a atividade dessa enzima quando comparado com os controles água destilada ou meio de cultivo BG 11.

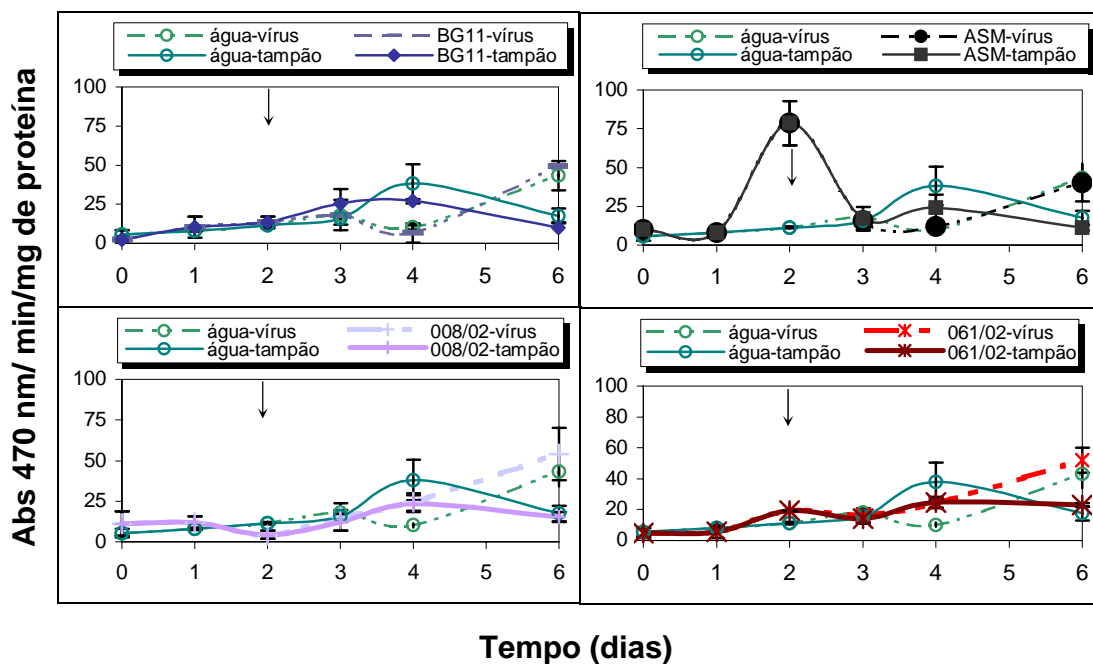


Figura 18 - Efeito nas folhas inferiores às tratadas com as suspensões de algas sobre a atividade de peroxidase em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

2.3.10 Verificação do conteúdo total de fenóis

Nenhum tratamento que envolveu as algas estimulou o acúmulo de fenóis nas plantas de fumo, cultivar TNN. Porém, seis dias após o tratamento, as plantas tratadas com água destilada ou meio de cultivo BG 11 e inoculadas com TMV, apresentaram maior teor de fenóis do que os outros tratamentos (Figura 19).

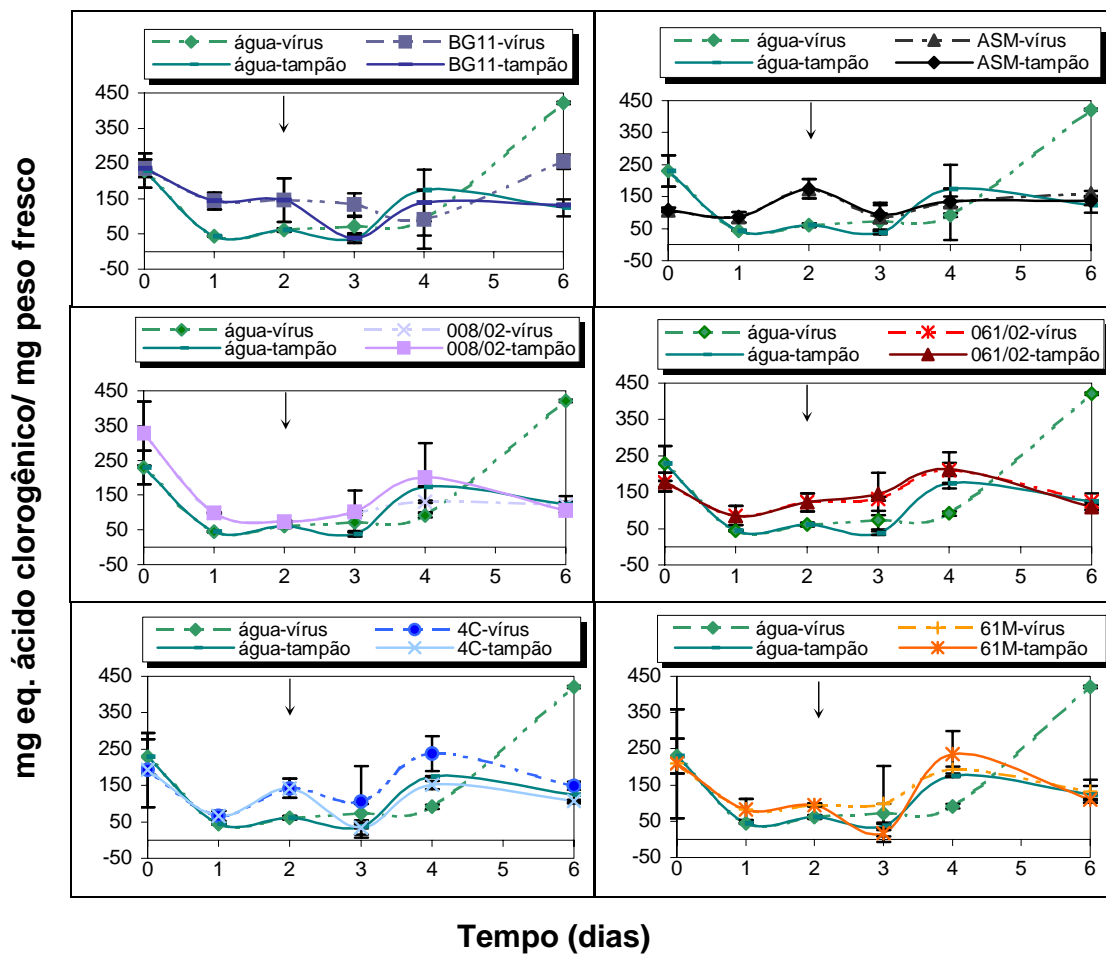


Figura 19 - Efeito local de suspensões ou de preparações de algas sobre a concentração de fenóis em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

Nas Figuras 20 e 21, observa-se que não houve diferença na concentração de fenóis entre os tratamentos nas meia folhas não tratadas ou nas folhas inferiores às tratadas.

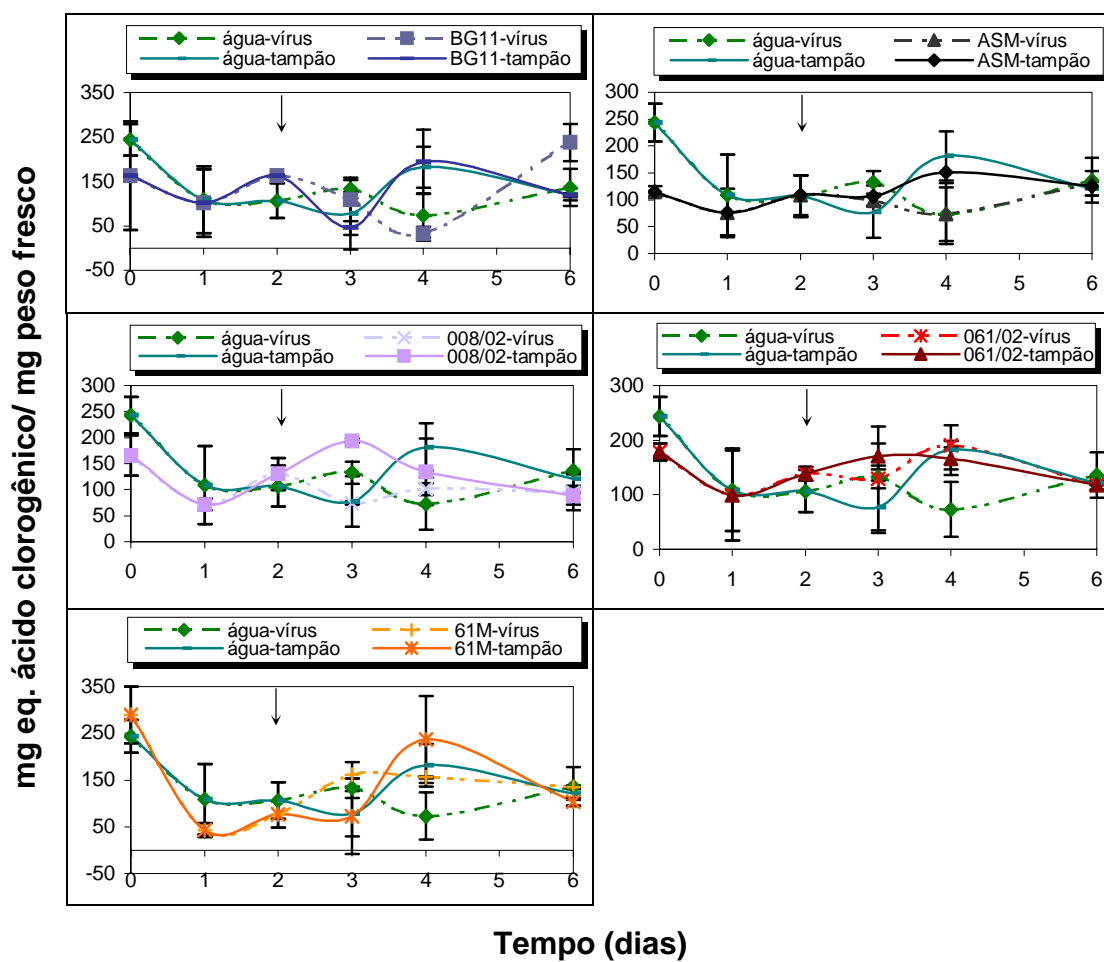


Figura 20 - Efeito nas meia folhas não tratadas de suspensão ou de preparações de algas sobre a concentração de fenóis em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

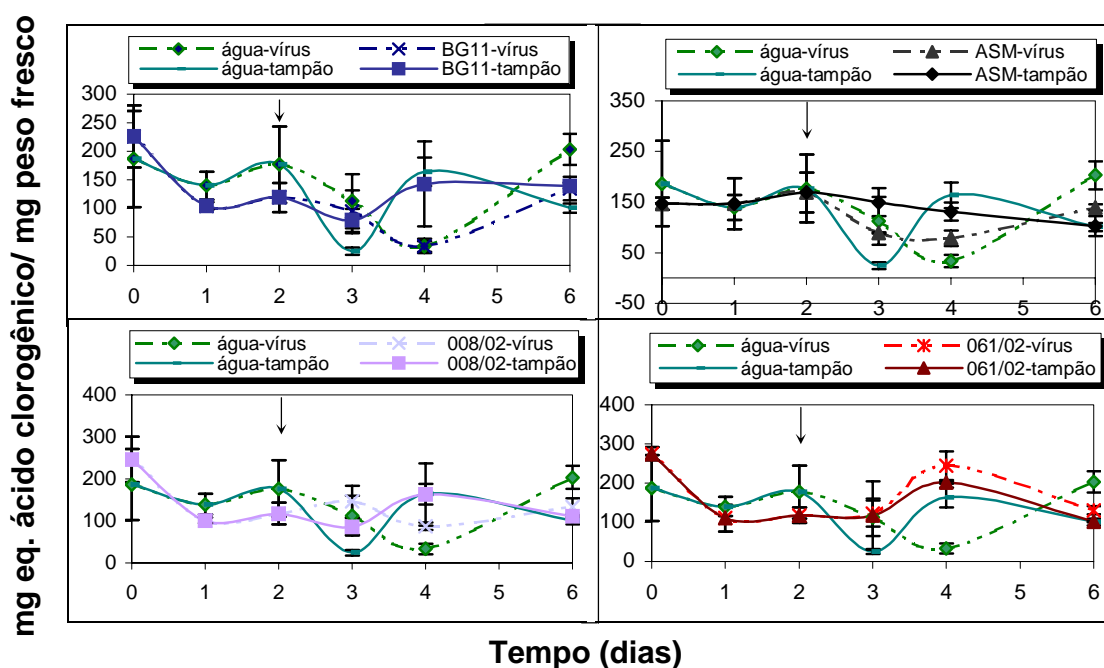


Figura 21 – Efeito nas folhas inferiores às tratadas com as suspensões de algas sobre a concentração de fenóis em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A seta indica o momento da inoculação com TMV. Barras representam a média \pm desvio padrão

2.3.11 Verificação de espécies ativas de oxigênio

Quando as plantas de fumo, cultivar TNN, foram tratadas com as suspensões dos isolados 008/02 e 061/02, bem como com a preparação 61 M, as mesmas apresentaram, visualmente, acúmulo local, bem como nas meia folhas não tratadas, de superóxido em relação aos controles água destilada e meio de cultivo BG 11. Porém, nas folhas inferiores à tratadas, essa diferença só pode ser detectada apenas nas plantas tratadas com a suspensão do isolado 008/02 (Figuras 22, 23 e 24).

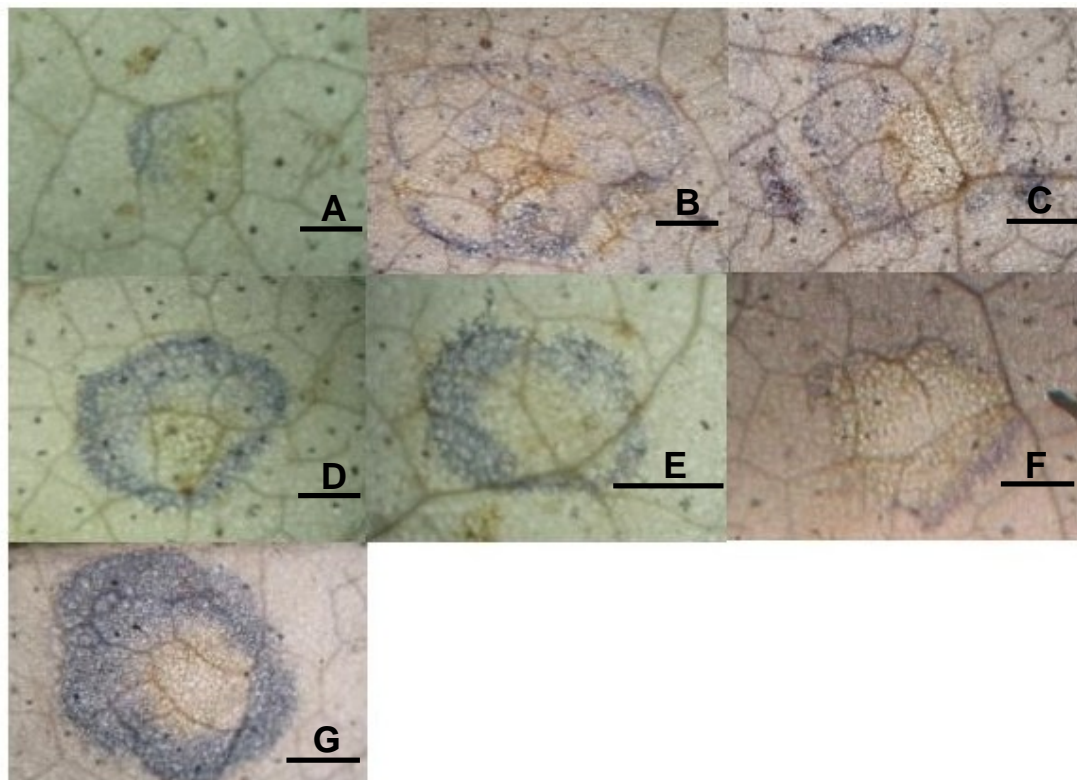


Figura 22 - Efeito local de suspensão ou de preparações de algas sobre a indução de superóxido em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM ($50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ i.a). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. F = preparação 4 C. G = preparação 61 M. Barras representam 1 mm

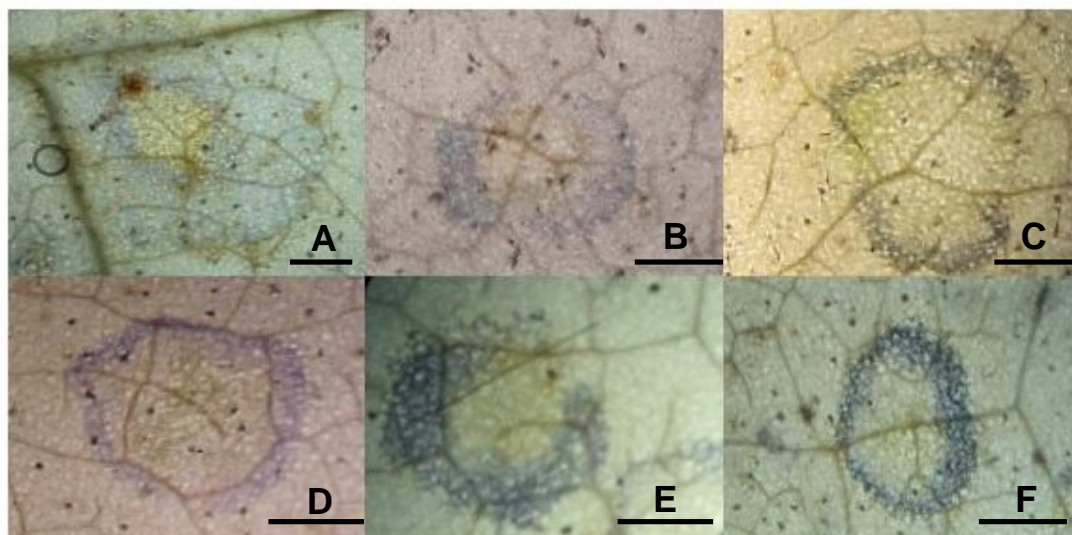


Figura 23 - Efeito nas meia folhas não tratadas de suspensão ou de preparações de algas sobre a indução de superóxido em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM ($50 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ i.a.}$). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. F = preparação 61 M. Barras representam 1 mm

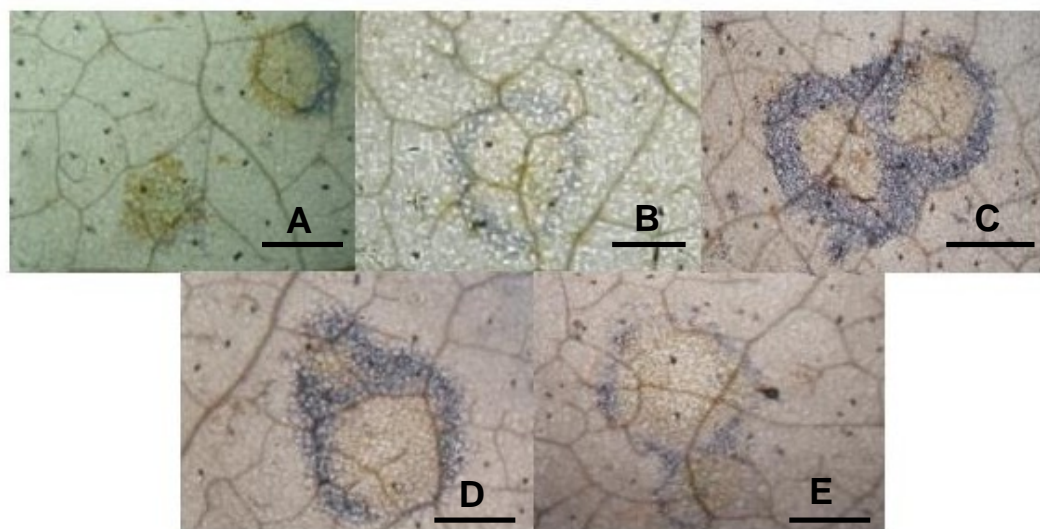


Figura 24 - Efeito na folha inferior á tratada de suspensão de algas sobre a indução de superóxido em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM ($50 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ i.a.}$). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. Barras representam 1 mm

Por sua vez na, na Figura 25 pode-se ver que apenas o controle ASM (50 mg.ml^{-1} i.a) , apresentou maior coloração que os demais tratamentos nas folhas tratadas. Por outro lado, aparentemente, as plantas tratadas com a preparação 4C apresenta menor coloração que os controles.

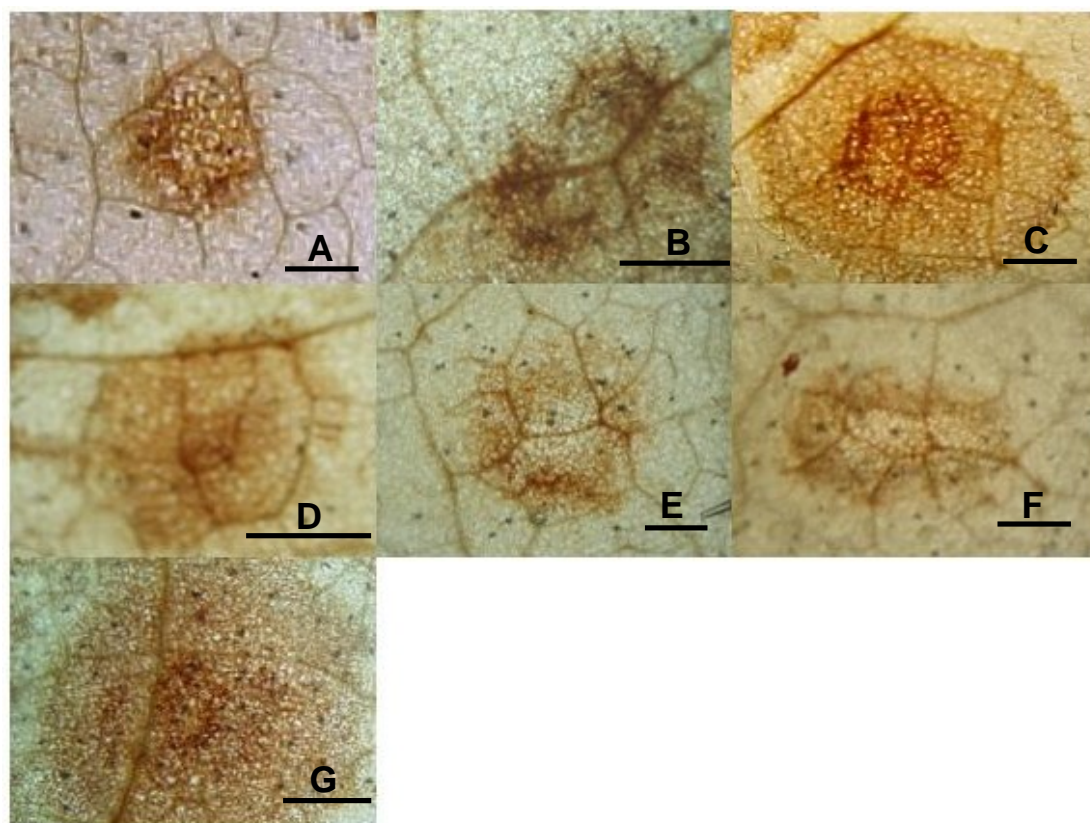


Figura 25 - Efeito local de suspensão ou de preparações de algas sobre o acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM (50 mg.ml^{-1} i.a). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. F = preparação 4 C. G = preparação 61 M. Barras representam 1 mm

As preparações de algas, aparentemente, não proporcionaram o acúmulo de H_2O_2 nas meia folhas não tratadas e nas folhas inferiores á tratadas 37h após a inoculação do TMV (Figuras 26 e 27).

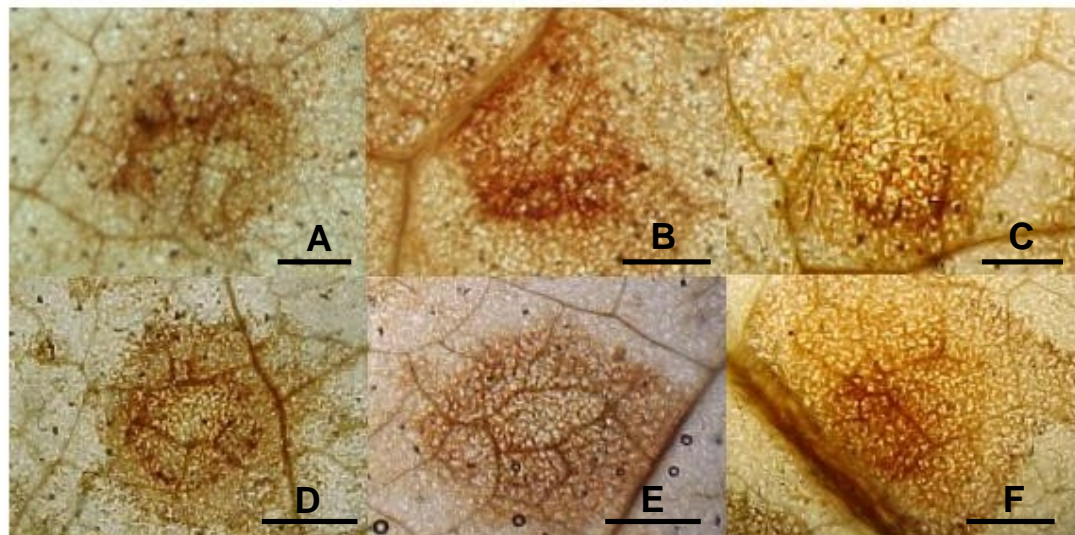


Figura 26 - Efeito nas meia folhas não tratadas de suspensão ou de preparações de algas sobre o acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM ($50 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ i.a}$). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. F = preparação 61 M. Barras representam 1 mm

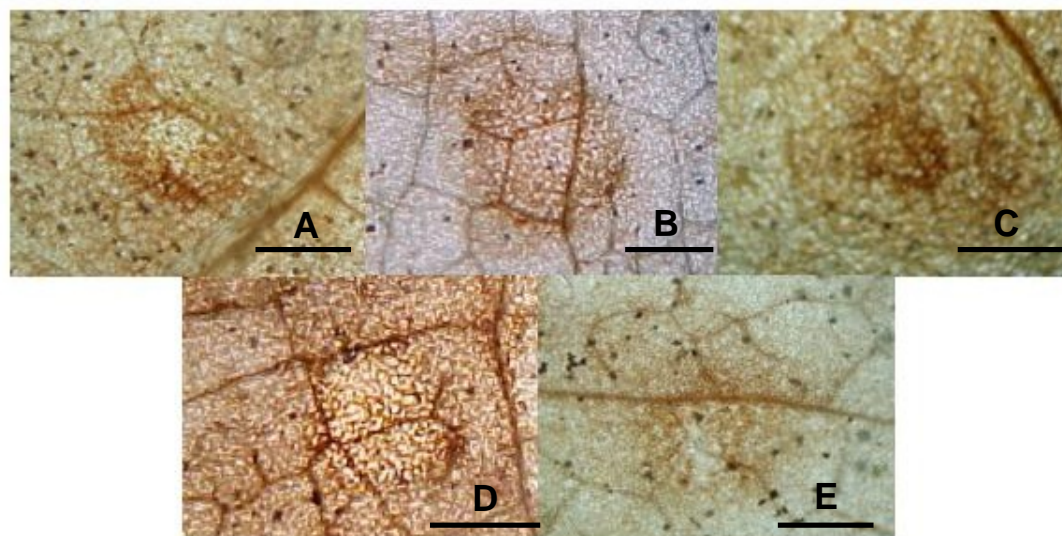


Figura 27 - Efeito nas folhas inferiores á tratadas de suspensão ou de algas sobre o acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de fumo, cultivar TNN, com 40 dias de cultivo, mantido sobre condições de casa-de-vegetação. A = água. B = meio de cultivo BG 11. C = ASM ($50 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ i.a}$). D = suspensão do Isolado 008/02. E = suspensão do Isolado 061/02. Barras representam 1 mm

2.4 Discussão

Quando as plantas de fumo foram tratadas com as algas Isolado 004/02, Isolado 008/02, Isolado 061/02, *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp. 61, as mesmas apresentaram efeito local, bem como sistêmico na redução dos sintomas provocados por TMV em plantas de fumo, cultivar TNN, porém para a *Nostoc* sp. 61, o resultado sistêmico do primeiro teste não foi confirmado. Em adição, as preparações 4 C e 61 M proporcionaram redução nos sintomas locais provocados pelo TMV em plantas de fumo, mas apenas a segunda preparação reduziu os sintomas sistemicamente. Esses resultados evidenciam que grande parte das moléculas com atividade sobre o TMV foram perdidas no momento da elaboração das preparações. Ademais, as algas podem apresentar mais de um composto que reduz os sintomas do TMV, visto que a suspensão do Isolado 004/02 apresentou efeito local e sistêmico, todavia o preparado 4 C apresentou efeito apenas local. Por outro lado, foi verificado que as suspensões dos isolados 090/02, *Anabaena* sp, *Nostoc* sp. 21 e *Nostoc* sp. 61, com 20 dias de cultivo, sob luz fluorescente constante a 28°C, apresentaram efeito direto sobre o TMV.

Esses resultados mostram que os isolados 090/02 e *Nostoc* sp. 21 apresentam compostos que agem sobre o TMV, mas não sobre a planta. Já as suspensões dos isolados *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp. 61, com vinte dias de cultivo, mantidos sob luz fluorescente constante a 28°C apresentaram efeito direto sobre o TMV, além de reduzir o número de lesões, locais e sistêmicas, quando o vírus foi inoculado 2 dias após o tratamento, o que pode significar que esses isolados apresentam compostos que agem sobre o vírus e podem também elicitar a resposta de defesa de plantas de fumo. Finalmente, os isolados 004/02, 008/02 e 061/02 reduziram os sintomas de TMV, apenas quando as plantas de fumos foram tratadas com os mesmos dois dias antes da inoculação. A falta de efeito direto sobre o vírus e o intervalo de tempo necessário entre o tratamento das plantas e a inoculação do vírus para que as plantas de fumo tenham os sintomas reduzidos, sugerem que as plantas tiveram os mecanismos de defesa ativados pelas algas (BONALDO, PASCHOLATI, ROMEIRO, 2005).

Zainuddin et al. (2002) mostraram que os extratos metanólicos das cianobactérias *Calothrix gracilis*, *Lyngbya* sp., *Microcystis ichthyoblabe*, *Nodularia spumigena*, *Oscillatoria lutea* e *Seytonema bohnereii*, bem como o extrato aquoso de *N. spumigena*,

reduziram em 50% o vírus A da gripe em concentrações entre 20 e 79 $\mu\text{g/ml}$. Em busca de melhorar o conhecimento científico no controle da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), diversos pesquisadores têm estudado compostos isolados de diferentes gêneros de cianobactérias. Extratos aquosos de *Arthrospira platensis* inibiram em 50% a replicação do HIV em células humanas em concentrações entre 0,01 a 0,1 g/ml (AYEHUNIE et al., 1998). Além disso, diversos autores (LOYA et al., 1998; RESSHEF et al., 1997; NAKASHIMA et al., 1988) verificaram que compostos das classes das glicoproteínas e das sulfoglicoproteínas, isolados de diferentes gêneros de cianobactérias, apresentaram efeito inibitório sobre o HIV. Lau et al. (1993) estudaram extratos lipofílicos e hidrofílicos de 900 grupos de cianobactérias na inibição da transcriptase reversa do HIV e do AMV. Seus resultados evidenciaram que 18 extratos hidrofílicos apresentaram efeito sobre os vírus estudados. Ademais, a maior dose estudada (668 ng/ml) dos extratos, reduziu a atividade da enzima de maneira semelhante ao AZT.

Di Piero (1999) mostrou que suspensões celulares de *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp., com 30; 60 ou 140 dias de cultivo, bem como preparações dos conteúdos intracelulares e dos meios de cultivos, com 30; 60 ou 140 de cultivo reduziram os sintomas locais provocados por TMV. Porém, apenas a suspensão celular da *Nostoc* sp., com 140 dias, reduziu os sintomas sistêmicos provocados pelo vírus.

Finalmente, Rao, Saranda e Raviss Shankar (1996) verificaram que a ficocianina, produzida por *Spirulina plantensis*, estimulou o acúmulo de capsaicina em cultura de células de *Capsicum frutescens* e de antocianina em cultura de células de *Daucus carota*. Di Piero (1999) verificou que suspensões, bem como o filtrado de meio de cultivo de *Synechococcus leopoliensis*, com 30, 60 e 120, elicitaram o acúmulo de fitoalexinas em folhas cotiledonares de soja.

A partir dos resultados obtidos, análises bioquímicas foram feitas para se verificar possíveis alterações metabólicas provocadas pelas algas nas plantas de fumo, cultivar TNN.

Não foi verificada diferença no teor total de fenóis nas plantas de fumo, cultivar TNN tratadas com os controles ou com as algas. É mister lembrar que as plantas, na presença do desafiador, acionam o metabolismo *de novo* de fenóis, ou sejam sintetizam fenóis mais tóxicos a partir de fenóis menos tóxicos ao invasor (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Em vista disso, apesar de não ser detectada diferença no teor total de fenóis, não

pode ser descartado que existam diferenças qualitativas entre a composição da fração fenólica das plantas tratadas com algas e as plantas controles.

Quanto às proteínas-RP, a preparação 4C estimulou a atividade local de peroxidases em plantas de fumo, cultivar TNN, 3 dias após o tratamento das plantas. Além disso, foi verificado que no sexto dia, as plantas inoculadas com vírus apresentaram maior atividade de peroxidases do que as inoculadas com tampão. Diversos autores também verificaram que a inoculação de TMV em fumo induz ao aumento da atividade de peroxidase (YE et al., 1992; ANFOKA; BUCHENAUER, 1997; LAGRIMINI; ROTHSTEIN, 1987). Hiraga et al. (2000) evidenciaram que a reação de hipersensibilidade (RH) observada em plantas de fumo com gene "NN" induzem a expressão do gene de peroxidases (*tpoxC1*) desse hospedeiro, porém em plantas "nn", nas quais não são observadas RH, essa expressão não foi observada, o que evidencia a importância dessa proteína-RP na defesa de fumo contra o TMV. Esse fato poderia explicar o menor número de lesões locais observadas em plantas de fumo tratadas com a preparação 4C. Porém, Kapoor e Lodha (2004) verificaram que plantas controles de fumo inoculadas com TMV apresentaram maior severidade dos sintomas que plantas tratadas com o inibidor de proteína viral *Bougainvillea* e inoculadas com o vírus, mas esse tratamento apresentou menor atividade de peroxidase.

Já a atividade de β -1,3-glucanase das plantas tratadas com o Isolado 008/02 apresentou um pico de atividade de glucanases três dias após o tratamento. Por sua vez, plantas tratadas com água destilada, meio de cultivo BG11 ou ASM (50 mg.ml^{-1} i.a.) e inoculadas com TMV tiveram a atividade dessa enzima aumentada a partir do quarto dia após o tratamento das plantas, porém as plantas tratadas com as algas, e inoculadas com vírus, não apresentaram aumento na atividade dessa enzima. Em vista disso, pode-se concluir que as algas impediram o aumento da atividade de β -1,3-glucanase em folhas de fumo inoculadas com TMV. A redução da atividade de β -1,3-glucanase poderia aumentar a deposição de calose, a qual reduz o limite de exclusão dos plasmodesmas, o que dificulta o movimento célula-a-célula de vírus (BOTHÁ et al., 2000). Vários trabalhos mostram que mutantes deficientes em glucanases são mais resistentes a vírus (BEFFA et al., 1996; IGLESIAS et al., 2000; BUCHER et al., 2001). Essa deposição de calose poderia ser mais eficiente no controle do vírus de que o efeito direto das glucanases sobre esses fitopatógenos (BEFFA et al., 1993). Ademais, a super expressão dessa enzima provocou o aumento dos sintomas dessa doença (BUCHER et al., 2001).

Finalmente, às análises para as detecções *in situ* de peróxido de hidrogênio e superóxido mostraram que as suspensões dos isolados 008/02 e 061/02, bem como a preparação 61 M proporcionaram maior acúmulo de O_2^- e o tratamento 4C reduziu a formação local de H_2O_2 . O reconhecimento de patógenos resulta na ativação da NAD(P)H oxidase associada com a membrana plasmática, o que provoca a superprodução de superóxido (JABS, 1999). Após, a enzima superóxido dismutase catalisa o O_2^- , o que leva ao acúmulo de H_2O_2 , a reação de hipersensibilidade e a ativação de mecanismos de defesa das plantas (KAWANO, 2003). Vários trabalhos relacionam decréscimo da atividade de catalase, enzima que catalisa o H_2O_2 em H_2O e O_2 , com o aumento de proteínas-RP e/ou AS (ORVAR; ELLIS, 1997; MITTLER, et al., 1999). Além disso, o acréscimo da atividade dessa enzima tem efeito apenas nos sintomas necróticos locais de TMV em plantas de fumo (TALARCZYK et al., 2002), o que poderia explicar a falta de controle sistêmico pela preparação 4C.

3 CONCLUSÕES

Alguns isolados de algas eucarióticas ou de cianobactérias apresentaram como promissores agentes de controle de doenças, pois podem apresentar efeito direto sobre patógenos e/ou promover alterações no metabolismo das plantas, que podem estar relacionados a biossíntese de compostos de defesa.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; Junior SALTVEIT, M. E. Ethylene in Plant Biology. In: GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Ethylene and flooding stress in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 1, p. 1-9, 2001.
- ABETZ, P.; YOUNG, C.L. The effect of seaweed extract sprays derived from *Aschophyllum nodosum* on lettuce and cauliflower crops. **Botanica Marina**, Hamburg, v. 26, p. 487-492, 1983.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.
- AGUIAR, M. de R. **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos**. 1992. 122 p. Dissertação (Mestrado em Solos e nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- AHN, P.; KIM, S.; LEE, Y. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. **Plant Physiology**, New York, v. 138, n. 3, p. 1505-1515, 2005.
- ALABOUVETTE, C; LEMANCEAU, P; STEINBERG, C. Biological control of fusarium wilts: opportunities for developing a commercial product. In: HALL, K. (Ed.). **Principles and practice of managing soil borne plant pathogens**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1996. chap. 9, p. 193-209.
- ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, New York, v. 92, p. 1-20, 1998.
- ANDERSEN, R.J.; LUU, H.; CHEN, D.Z.X.; WILLIAMS, D.E. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon “netpen liver disease”. **Toxicon**, Oxford, UK, v. 31, n. 10, p. 1315-1323, 1993.
- ANDREU, A.; TONON, C.; VAN DAMME, M.; HUARTE, M.; DALEO, G. Effect of glucans from different races on defense reactions in potato tuber. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 777-783, 1998.
- ANFOKA, G.; BUCHENAUER, H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* pre-inoculation with tobacco necrosis virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 2, p. 85-101, 1997.
- ASSANTE, G.; MAFFI, D.; SARACCHI, M.; FARINA, G.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycology Research**, Oxford, UK, v. 108, n.2, p. 170-182, 2004.
- AYEHUNIE, S.; BELAY, A.; BABA, T. W.; RUPRECHT, R. M. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, Philadelphia, v. 18, n. 1,p. 7-12, 1998.

BAYSAL; Ö, SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzyme and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavivacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 747-753, 2003

BEFFA, R. S.; NEUHAUS, J. M.; MEINS, Junior, F. Physiological compensation in antisense transformants: Specific induction of an glucan endo-1,3- β - glucosidase in plants in plants infected with necrotizing viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 8792-8796, 1993.

BEFFA, R. S.; HOFER, R. M.; THOMAS, M.; MEINIS Junior, F. Decreased susceptibility to virus disease of β - 1,3-glucanase deficient plants generated by antisense transformation. **Plant cell**, Rockville, v. 8, p. 1001-1011, 1996.

BEIJEIRINCK, M.W. **Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves**. Tradução de J. Johnson. 2nd ed. Ithaca: The Cayuga Press, 1968, p. 33-52.

BELTRAME, A. B.; PASCHOLATI, S. F. Influência *in vitro* e *in vivo* de cianobactérias sobre *Podosphaera xanthii*, agente causal do oídio em pepino. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 31, supl., p. 173, 2005. Resumo.

BOLLER, T. Ethylene and plant-pathogen interaction. **Current Topics in Plant Physiology**, Rockville, v. 5, p. 138-145, 1990.

BONALDO, S.M. **Efeito de *Sacchromyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, germinação e formação de apressórios de fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R. da S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO R.M.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005 cap. 1, p. 11-27.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiples attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BOTHA, C.E.; CROSS, R.H. Towards reconciliation of structure with function in plasmodesmata-who is the gatekeeper? **Micron**, Oxford, UK, v. 31, p. 713-721, 2000.

BOUDJEKO, T.; OMOKOLO, N.A.; DRIOUICH, A.; BALANGÉ, A.P. Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7/8, p. 409-416, 2005.

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**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAY, H.G.; THORPE, W.V. Analysis of phenol compounds of interest in metabolism. **Methods in Biochemistry Analysis**, New York, v. 1, p. 1194-1196, 1954.

BROENMARK, C.; MINER, J. Predation-induced phenotypical change in body morphology in crucian carp. **Science**, Washington, DC, v. 258, p. 1348-1350, 1992.

BUCHER, G.L.; TARINA, C.; HEINLEIN, M.; DI SERIO, F.; JR MEINS, F.; IGLESIAS, V.A. Local expression of enzymatically active class I β -1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 28, n. 3, p. 361-369, 2001.

BUNKER, T.W.; KOETJE, D.S.; STEPHENSON, L.C.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 7, p. 1319-1331, 1995.

BURJA, M.A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J. G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetraedron**, Oxford, UK, v. 57, n. 46, p. 9347-9377, 2001.

CAMERON, R.K.; ZATON, K. Intercellular salicylic acid accumulation is important for age-related resistance in *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n.4, p. 197–209, 2004.

CAMPBELL, R. Biological control of soil borne diseases: some present problems and different approaches. **Crop Protection**, Guildford, v. 13, p. 1-13, 1994.

CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K. SCAAD, M.C. Cell-to-cell and long distance movement of virus in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1669-1681, 1996.

CASTRO, O.L.; BACH, E.E. Increased production of β -1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 2, p. 165-169, 2004.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO R.M.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005 cap. 4, p. 81-123.

CHENG, N.H.; SU C.L.; CARTER, S.A.; NELSON, R.S. Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus. In: CULVER, J.N. Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 287-308, 2002.

CHET I. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley, 1987, chap.6, p. 137-160.

CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Journal**, Oxford, UK, v. 24, p. 667-677, 2000.

COHEN, Y. GISI, U.; NIEDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* in tomato and potatoes plants by jasmonic acid and jasmonic methyl-ester. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p.1054-1062, 1993.

COEGO A.; RAMIREZ, V.; ELLUL, P.; MAYDA, E.; VERA, P. The H₂O₂-regulated *Ep5C* gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 42, p. 283-293, 2005.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

COSTA, H.S.; RÍOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n.1, p. 19-25, 2000.

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

COX, P.A.; BABACK, S.A.; MURCH, S. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among Chamorro people of Guam. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washinhton, v. 100, n. 23, p. 13380-13383, 2003.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

CROFT, K. P. C.; JÜTTNER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, New York, v. 101, p. 13-24, 1993.

CULVER, J.N. *Tobacco Mosaic Virus* Assembly and Disassembly: Determinants in Pathogenicity and Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 287-308, 2002.

DE CAIRE, G.Z.; DE MULÉ, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R.; GALBAGNO, M. Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, **Phyton**. Buenos Aires, v. 47, p. 43-46, 1987.

DE MULÉ, M.C.Z.; DE CAIRE, G.Z.; DOALLO, S.; HALPERIN, D.R. de; HALPERIN, L. Action of aqueous and ethereal algal extracts of *Nostoc muscorum* Ag. (No 79 a). II. Effect on the development of the fungus *Cunninghamella blakesleeana* in Mehlich's medium. **Boletín de la Sociedad Argentina Botánica**, Cordoba, v.18, p. 121-128, 1977.

DELANEY, J.M.; WILKINS, M. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. **Toxicon**, Oxford, UK, v. 33, n. 6, p. 771-778, 1995.

DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, London, v. 394, p.585-588, 1998.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, München, v. 159, p. 371-394, 2004.

DI PIERO, R.M. **Efeito das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. sobre fitopatógenos e nas interações sorgo (*Sorghum bicolor*) - *Colletotrichum sublineorum* e fumo (*Nicotiana tabacum*) - Vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus" - TMV)**. 1999. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

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. 171 p. (Tese Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, p. 794-800, 1989.

DUBERY, I. A. AND V. SLATER. Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, p. 1429-1434, 1997.

EGEA, C.; AHMED, A. S.; CANDELA, M.; CANDELA, M.E. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, n. 2, p. 151-158, 2001.

ELSON, M.K.; SCHISLER, D.A.; BOTHAST, R.J. Selection of microorganisms for biological control of silver scurf (*Helminthosporium solani*) of potato tubers. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 81, p. 647-652, 1997.

FALCONER, I. R. A review of problems caused by toxic blue-green-algae (cyanobacteria) in drinking and recreative water. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 14, n. 1, p. 5-12, 1999.

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHYB, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, UK, v.37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2004.

- FOLMAN, L.B.; POSTMA, J.; VAN VEEN, J.A. Characterization of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. **Microbiology Research**, Jena, v.158, p.107-115, 2003.
- FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEAGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, p. 16-22, 1998.
- FYDA, J.; WIACKOSKI, K. Benefits and costs of predator-induced morphological changes in the ciliate *Colpidium klecini* (Protozoa, Ciliophora). **European Journal of Protistology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 118-123, 1998.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNESS, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, L. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 261, n. 5122, p. 754-756, 1993.
- GARMENDIA, I.; GOICOECHEA, N.; AGUIRREOLEA, J. Moderate drought influences the effect of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Verticillium*-induced wilt in pepper. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 15, n. 5, p. 345-356, 2005.
- GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 28, p. 303-310, 2002.
- GOWDA, P.S.B.; BHAT, S.G.; BHAT, S.S. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in sorghum and *Peronosclerospora sorghi* interaction. **Current Science**, Bangalore, v. 58, n. 18, p. 1037-1039, 1989.
- GRANT, J.J.; LAAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, New York, v. 124, p. 21-29, 2000.
- GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Ethylene and flooding stress in plants, **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, n. 39 v. 1, p. 1-9, 2001.
- GRIESEBACH, H. Lignins. In: CON, E. E.; STUMPEF, P.K. (Ed.) **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1981, cap. 15, p. 457-479.
- GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; AND ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National of Science of the United States of America**, Washinhton, v. 89, p. 2389–2393,1992.
- HALLEGRAEFF, G.M. Harmful algal blooms in the Australian region. **Marine Pollution Bulletin**, London v. 25, p. 186-190 1992.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexin accumulation: response or defense. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 3, p. 125-126, 2003.

HAMMERSCHMIDT, R. To challenge or not to challenge: Determining the costs of induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 66, p. 1–2, 2005.

HARTLEB, H.; HEITEFUUS, R.; HOPPE, H.H. **Resistance of crops plants against fungi**. Munique: Gustav Fischer Verlag Jena, 1997, chap 9, p.183-201.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, M. An extract of *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of *Herpes simplex virus* tipe-1 penetration into HeLa cells. **Phytotherapia Research**, London, v. 7, p. 7680-7680, 1992.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 42, p. 462-468, 2001.

HIRAGA, S.; ITO, H.; YAMAKAWA, H.; OHTSUBO, N.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MATSUI, H.; HONMA, M.; OHASHI, Y. An HR-induced tobacco peroxidase geneis responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 13, n. 2, p. 210-216, 2000.

HÜCKELHOVEN, R.; FODOR, J.; TRUJILLO, M.; KOPEL, K. Barley Mla and Rar mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability accumulate reactive oxygen intermediates sites of fungal invasion. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 16-24, 2000.

HULEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and *Varicella zoster viruses*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht v. 13, p. 127-134, 2001.

IGLESIAS, V.A. MEINS Junior F. Moviment of plant viruses is delayes in β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. **Plant Journal**, Oxford, UK, v. 21, p. 157-166, 2000.

ISAAC, S. **Fungal and plant interactions**. In: LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Sacchomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ISHERWOOD, F.A. Lignification. In: PRIDHAM, J.B. (Ed.). **Phenolics in plants in health and disease**. London: Pergamon Press, 1960. chap. 2, p. 45-72.

IVANOWSKI, D. **Concerning the mosaic disease of the tobacco plant**. Tradução de J. Johnson. 2nd ed. Ithaca: The Cayuga Press, 1968, 27-30 p.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 57, n.3,p. 231-245, 1999.

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

JJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- β -1,3- glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 335-343, 1998.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; JISI A.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.; de MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal Medicine**, Waltham, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

JULLIARD, R.; STENSETH, N.C.; GJOSAETER, J.; LEKVE, K.; FROMENTIN, J.M.; DANIELSSEN, D.S. Natural mortality and fishing mortality in a coastal cod population: a release-recapture experiment **Ecological Applications**, Washington, v. 11, n. 2, p. 540-558, 2001.

KANKAANPÄÄ, H.; VUORINEN, P.J.; SIPIÄ, V.; KEINÄNEN, M. Acute effects and bioaccumulation in sea trout (*Salmo trutta trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 61, n. 3/4, p. 155-168, 2002.

KAPAT, A.; ZIMAND, G.; ELAD, Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* of activity by *Botrytis cinera*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, London, v. 52, p. 127-137, 1998.

KAPOOR, S.B.H.C.; LODHA, M.L. Modification of antioxidant status of host cell in response to *Bougainvillea* antiviral proteins. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New Delhi, v. 13, p. 113-118, 2004.

KAWANO, T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. **Plant Cell Reporter**, New York, v. 21, n. 9, p. 829-837, 2003.

KNOESTER, M.; VAN LOON, L.C.; VAN DEN HEUVEL, J.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. **Proceedings of the National Science of the United States of America**, Washinhton, v. 95, p. 1933-1937, 1998.

KNOESTER, M.; PIETERSE, C.M.J.; BOL, J.F.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v.12, n. 8, p. 720-727, 1999.

KNOESTER, M.; LINTHORST, H.J.M.; BOL, J.F.; VAN LOON, L.C. Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 45-57, 2001.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, Orlando, v. 22, n. 2, p. 149-158, 2001.

KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor- induced reactions. **Plant Physiology**, New York, v.81, n.1, p.216-221, 1986.

KOMBRINK, E.; SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2001.

KULIK, M.M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 585-599, 1995.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathway in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, n. 5, p. 325-331, 2002.

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. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAMBERT, T.W.; HOLMES, C.B.F.; HRUDEY, S.E. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. **Environmental Review**, Denver, v. 2, p. 167-186, 1994.

LAGRIMINI, L.M.; ROTHSTEIN, R. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, New York, v. 84, p. 438-442, 1987.

LARKIN, R.P.; FRAVEL, R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 82, n.9, p. 1022-1028, 1998.

LAU, A. F.; SIEDLECKI, J.; ANLEITNER, J.; PATTERSON, G.M.; CAPLAN, F.R.; MOORE, R E. Inhibition of reverse transcriptase activity by extracts of cultured blue-green algae (cyanophyta) **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, n. 2, p. 148-151, 1993.

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

LOYA, S.; RESSHEF, V.; SILBERSTEIN, C.; RACHMIM, Y.; CARMELI, S.; HIZI, A. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: Contribution of different moieties to their high potency. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 61, n. 7, p. 891-895, 1998.

LU, Y.; CHEN, C. Molecular analysis of lily leaves in response to salicylic acid effective towards protection against *Botrytis elliptica*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 1-9, 2005.

LUND, S.T; STALL, R.E; KLEE, H.J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 371-382, 1998.

LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 81, p.33-77, 1993.

MADSEN, A.M.; NEERGAARD, E. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 761-768, 1999.

MAO, W.; LEWIS, J.A.; HEBBAR, P.K.; LUMSDEN, R.D. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing maize damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 81, n.5, p.450-454, 1996.

MATUSIAK, K.; KRZYWICKA, A. Influence of the extract of *Chlorella vulgaris* on growth of fungi. In: DI PIERO, R.M. **Efeito das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. sobre fitopatógenos e nas interações sorgo (*Sorghum bicolor*) - *Colletotrichum sublineorum* e fumo (*Nicotiana tabacum*) - Vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus" - TMV)**. 1999. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

MAUCH, F.; HADWIGER, L.A.; BOLLER, T. Ethylene – symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. **Plant Pathology**, London, v. 76, n. 3, p. 607-611, 1984.

MAUCOURT, K.; AGARWAL, M.; RENÉ, B.; FERMANDJIAN, S. Use of *Chamydomonas reinhardtii* for anticancer drug screening. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 64, p. 1125-1113, 2002.

MAYER, A. **Concerning the mosaic disease of tobacco**. Tradução de J. Johnson. 2nd ed. Ithaca: The Cayuga Press, 1968, 11-24 p.

McQUILKEN, M. P.; GEMMELL, J.; LAHDENPERA, M.L. *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 3/4, p. 171-178, 2001.

MEDINA, M.J.H; GAGNON, H PICHÉ, Y. CAMPO, J.A.; GARRIDO, J.M.G, VIERHEILIG, H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant, **Plant Science**, Clare, v. 164, n.6, p. 993- 998, 2003.

METTING, B. The systematics and ecology of soil algae. **The Botanical Review**, New York, v. 47, n. 2, p. 195-312, 1981.

MERCIER, J.; MANKER, D.C. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n.4, p. 355-362, 2005.

MILLIGAN, K.E.; MARQUEZ, B.L.; WILLIAMSON, R.T.; GERWICK, W.H. Lyngbyabellin B, a toxic and antifungal secondary metabolite from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 63, p. 1440-1443, 2000.

MITTLER, R.; SHULAEV, V.; LAM, E.; COHEN, M. Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 1025-1035, 1999.

MONTERO, M.; SANZ, L.; REY, M.; MONTE, E.; LLOBELL, A. BGN16.3, a novel acidic β -1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. **FEBS Journal**, Oxford, UK, v. 272, n. 13, p. 3441–3448, 2005.

NAKASHIMA, H.; TANABE, A.; TOCHIKURA, T.S.; YAMAMOTO, N. Rapid screening method with a cell multisizer for inhibitor of human immunodeficiency virus-induced cell fusion *in vitro*. **Journal of Clinical Microbiological**, Washington, DC, v. 26, n. 6, p. 1229-1232, 1988.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 30, p. 369-389, 1992.

NISHIZAWA, Y.; SARUTA, M.; NAKAZONO, K.; NISHIO, Z.; SOMA, M.; YOSHIDA, T.; NAKAJIMA, E.; HIBI, T. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 143–152, 2003.

NOGLE, L.M.; GERWICK, W.H. Somocystinamide A, a novel cytotoxic disulfide dimer from a fijian marine cyanobacterial mixed assemblage. **Organic Letters**, Washington, v. 4, n. 7, p. 1095-1098, 2002.

ORVAR, B.L.; ELLIS, B.E. Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 11, n. 6, 1997, p. 1297-1305, 1997.

OSTENSVIK, O.; SKULBERG, O.M.; UNDERDAL, B.; HORMAZABAL, V. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 84, p. 1117-1124, 1998.

PANDEY, U.; PANDEY, J. Antibacterial properties of cyanobacteria: A cost-effective and eco-friendly approach to control bacterial leaf spot disease of chilli. **Current Science**, Bangalore v. 82, n. 3, p. 262-264, 2002.

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

PASCHOLATI, S.F.; RIZZO, A.F.; WULFF, N.A.; AZEVEDO, M.T.P. Efeito de preparações de células homogeneizadas das cianobactérias *Anabaena* sp., *Limnothrix planctonica* e *Rhabdogloea brasílica* sobre *Colletotrichum graminicola* e no acúmulo de fitoalexinas em sorgo. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v. 24, p. 77, 1998. Resumo.

PELCZAR Junior, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Tradução de Tânia Veda Nakamura, Benedito Pradodias Filho, Luciana Sartor Lima. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996. 517 p.

PENNINCKX, I.A.M.A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.G.; THOMMA, B.P.H.J.; DE SAMBLANX, G.W.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.-P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene *in Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.2309-2323, 1996.

RAMOT, O.; VITERBO, A.; FRIESEM, D.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. **Current Genetics**, Berlin, v.45, p.205–213, 2004.

RANA, L.X.; LIUB, C.Y.; WUB, G.J.; VAN LOONA, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 111-120, 2005.

RAO, S.R.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 46, n. 5-6, p. 619-621, 1996.

RAO, D.V.S; PAN, Y.; AL-YAMANI, F. Growth and photosynthetic rates of *Chlamydomonas plethora* and *Nitzschia frustula* cultures isolated from Kuwait Bay, Arabian Gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture. **Marine Ecology**, Napoli, v. 26, p. 63-71, 2005.

RAO, P.V.L; BHATTACHARYA, R.; PARIDA, M.M.; JANA, A.M.; BHASKAR, A.S.B. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 5, n.1, p. 1-6, 1998.

RAY, H.; HAMMERSCHMIDT, R. Response of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 81-92, 1998.

REIMANN, S.; DEISING, H.B. Inhibition of Efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 6, p. 3269-3275, 2005.

RESSHEF, V.; MIZRACHI, E.; MARETZKI, T.; SILBERSTEIN, C.; LOYA, S. HIZI, A.; CARMELI, S. New acylated sulfolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 60, n. 12, p. 1251-1260, 1997.

RICHARDS, R. W.; ROTHSCHILD, J. M.; WILLIS, A. C.; DE CHAZAL, N. M.; KIRK, J.; KIRK, K.; SALIBA, K. J.; SMITH, G. D. Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. **Tetrahedron**, Oxford, UK, v. 55, n.47, p. 13513-13520, 1999.

RIVERA, M.E.; CODINA, J.C.; OLEA, F.; DE VICENTE, A.; PÉREZ-GARCIA, A. Differential expression of β -1,3-glucanase in susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 257-265, 2002.

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

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H. HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.1809-1819, 1996.

SALIGKARIAS, I.D.; GRAVANIS, F.T.; EPTONA, H.A.S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182 : a study on mode of action. **Biological Control**, Orlando, v. 25, p. 151-161, 2002.

SANZ, L.; MONTERO, M.; GRONDONA, VIZCAÍ, I.G.J.A.; HERMOSA, A.L.R.; MONTE, E. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. **Current Genetics**, Berlin, v. 46, n. 5, p. 277–286, 2004.

SEKI, H.; NAGASUGI, Y.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, T. Changes *in vivo* DNA-protein interactions in pea phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase gene promoter induced by fungal signal molecules. **Plant Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 40, p. 88-95, 1999.

SHEW, H.D.; LUCAS, G.B. **Compendium of tobacco diseases**. APS Press: Sant. Paul, 1990. 68p.

SHIRLEY, B.W. Flavonoid biosynthesis: 'new' function for an 'old' pathway. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 377-382, 1996.

SIEGRIST, J.; MUHLENBECK, S.; BUCHENAUER, H. Cultured parsley cell, a model system for rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.53, p. 223-238, 1998.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, London, v. 132, p. 1-45, 1996.

SMITH D. C.; VAN BUSKIRI. Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. **American Naturalist**, Chicago. v. 145, n. 2, p. 211-233, 1995.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia redalli* (Cichidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 70, n. 1, 1-10, 2004.

SONG, F.; GOODMAN, R.M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance, **Molecular Plant–Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 14, p. 1458–1462, 2001.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.P. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 20, p. 16-21, 1994.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.

STANLEY, W.M. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of Tobacco mosaic virus. **Science**, Washington, v.8, n. 2113, p., Jun 1935.

STEPHENSON W.M. The effect of hydrolyzed seaweed on certain plant pests and diseases. In: KULIK, M.M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 585-599, 1995.

STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; KABWE, M.K.; HAUNG, Z.; ADEYEYE, O.; PUSEY, L.P.; TANG, A.Y.A. Induced resistance of sweet potato to Fusarium root rot by UV-C. **Crop Protection**. Guildford, v. 18, p. 463-470, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 35, p. 235-270, 1997.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. In: CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO R.M.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, FEALQ, 2005 cap. 4, p. 81-123.

TALARCZYK, A; KRZYMOWSKA, M.; BORUCKI, W.; HENNIG, J. Effect of yeast *cta1* gene expression on response of tobacco plants to tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, New York, v. 129, p. 1032-1044, 2002

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução de E.R. SANTARÉM; J.E.de A. MARUATH; L.V. ASTATITA; L.R. DILLENBURG; L.M.G. ROSA; P.L.de OLIVEIRA,. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, Reading, v. 151, p.1691-1695, 2005.

TAKENAKA, H.; YAMAGUCHI, Y.; SAKAKI, S.; WATARAI, K.; TANAKA, N.; HORI, M.; SEKI, H.; TSUCHIDA, M.; YAMADA, A.; NISHIMORI, T.; MORINAGA, T. Safety evaluation of *Nostoc flagelliforme* (Nostocales, Cyanophyceae) as a potential food. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, p. 1073-1077, 1998.

THOMMA, B.P.H.J; NELISSEN, I.; EGGERMONT, K.; BROEKAERT, W.F. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **Plant Journal**, Oxford, UK, v.19, p.163-171, 1999.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**. Oxford, UK, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. **Molecular and Plant Microbe Interaction**, Sant Paul, v.15, p. 27-34, 2002.

TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIARI, P.; DE BERNARDIS, F.; BERTI, F.; GALLI, C.; NORELLI, F.; BELLUCCI, C.; POLONELLI, L.; COSTANTINO, P.; RAPPUOLI, R.; CASSONE, A. A novel glyco-conjugate

vaccine against fungal pathogens. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 202, n. 5, p. 597-606, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, Tradução de Agnes Kiesling Casali et al. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

VAIRAPPAN, C.S.; SUZUKIA, M.; ABEB, T.; MASUDAC, M. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 58, p. 517-523, 2001.

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

VERBERNE, M.C.; HOEKSTRA, J.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. **Plant Journal**, Oxford, UK, v. 35, p. 27-32, 2003.

VERBERNE, M.; VERPOORTE, R.; BOL, J.F.; MERCADO-BLANCO, J.H. LINTHORST, J.M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

WANG, Y.C.; HU, D.W.; ZHANG, Z.G.; MA, Z.C.; ZHENG, X.B.; LI, D.B. Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and chinese cabbage. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, p. 223-232, 2003.

WEISE, G.; DREW, G.; JANN, B.; JANN, K. Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell wall of the blue green alga *Anacystis nidulans*. **Archives of microbiology**, Heidelberg, v. 71, p. 89-98, 1970.

WILHITE, S.E.; LUMSDEN, R.D.; STRANEY, D.C. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping off. **Pytopathology**, Sant Paul, v. 84, p. 816-821, 1994.

WROBEL-KWIATKOWSKA, M.; LORENC-KUKULA, K.; STARZYCKI, M.; OSZMIAN'SKI, J.; KEPCZYN'SKA, E.; SZOPA, J. Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 5, p. 245-256, 2004.

WU, C.; MAURER, C.; WANG, Y.; XUE, S.; DAVIS, D.L. Water pollution and human health in China. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, p. 251-256, 1999.

WU, G.; SHORTT, B.J.; LAWRENCE, E.B.; LEÓN, J.; FITZSIMMONS, K.C.; LEVINE, E.B.; RASKIN, I.; SHAH, D.M. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. **Plant Physiology**, New York, v. 115, n. 2, p. 427-435, 1997.

XU, N.; FAN, X.; YAN, X.; LI, X.; NIU, R.; TSENG, C.K. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodospira confervoides*. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 62, p. 1221-1224, 2003.

XU, Y.; CHANG, P.F.L.; LIU, D.; NARASIMHAN, M.L.; RAGHOTHAMA, K.G.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1077-1085, 1994.

YAMAMOTO, A.; KATOU, Y.; SHINPEI; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. **Journal Genetics Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, p. 85-92, 2004.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 253-262, 2005.

YE, X.S.; JARFORS, U.; TUZUN, S.; PAN, S.Q.; KUC, J. Biochemical changes in cell walls and cellular responses of tobacco leaves related in systemic resistance to blue mold induced by tobacco mosaic virus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n.1, p. 49-57, 1992.

YOSHIKAWA, M.; TSUDA, M.; TAKEUCHI, Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-glucanase, from soybean. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 80, p. 417-420, 1993.

ZAINUDDIN, E. N.; MUNDT, S.; WEGNER, U.; MENDEL, R. Cyanobacteria - a potential source of antiviral substances against influenza virus. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 191, n. 3-4, p. 181-182, 2002.

ANEXO

Anexo A - Meio de cultivo BG 11

Componentes	Concentração (g/l)	Componentes	Concentração (g/l)
Solução 1:		Solução 3:	
NaNO ₃	3,0	K ₂ HPO ₄	3,9
MgSO ₄ .H ₂ O	0,15		
Na ₂ CO ₃	0,04	Solução 4:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,071	H ₃ BO ₃	2,86
Solução 2:		MnCl.4H ₂ O	1,81
EDTA (Anidro)	0,1	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
Ácido cítrico.H ₂ O	1,32	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
		Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05

Preparo do meio:

Solução:	1	2	3	4	Água
Volume:	500 ml	10 ml	10 ml	1 ml	479 ml

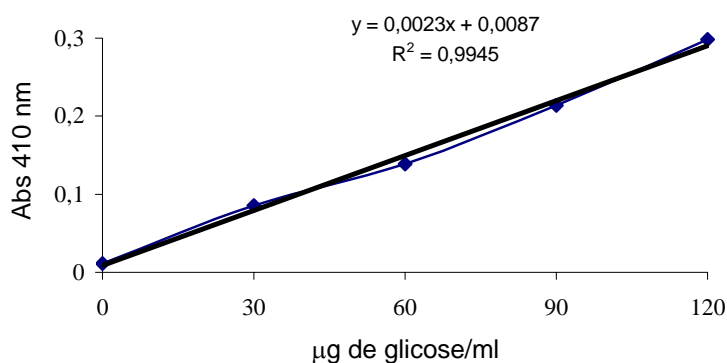
Obs.: A solução 1 e H₂O são combinadas e autoclavadas. O pH dessa solução deverá estar em torno de 9,0 - 9,5.

As soluções 2, 3 e 4 são autoclavadas individualmente e mantidas em frascos separados para se evitar a precipitação dos nutrientes.

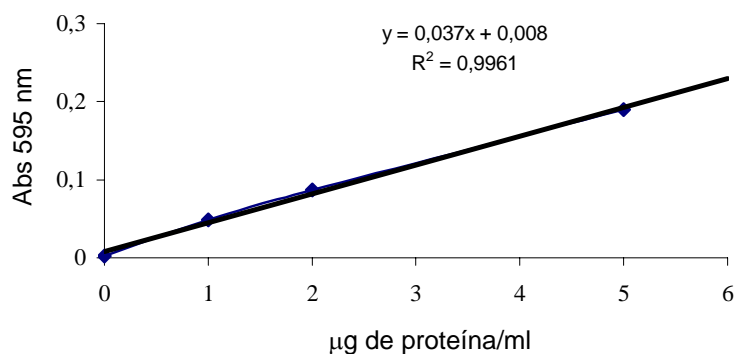
A adição das soluções 2; 3 e 4 após a autoclavagem causa uma alteração considerada no pH do meio não tamponado, que deve estar em torno de 6,8.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curva padrão para a dosagem de glicose através do método de Lever (1972)



APÊNDICE B - Curva padrão para dosagem de proteína, com o emprego do método de Bradford (1976)



APÊNDICE C - Curva padrão para dosagem de fenóis preparada com ácido clorogênico

