

Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal

Ricardo Ferrari Silva¹, Sérgio Florentino Pascholati², Ivan Paulo Bedendo²

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, CP 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP; e-mail: ipbedend@esalq.usp.br ¹Bolsista CAPES. ²Bolsistas CNPq. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Autor para correspondência: Sérgio F. Pascholati

Data de chegada: 09/02/2007. Aceito para publicação em: 16/01/2008

1447

RESUMO

Silva, R.F.; Pascholati, S.F.; Bedendo, I.P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.137-144, 2008

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, é considerada uma doença de importância para a cultura da berinjela, sendo de difícil controle. O controle de doenças através de indução de resistência é um método que vêm se revelando como promissor. Basidiomas de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* possuem substâncias do tipo antibiótico e outras substâncias capazes de atuarem como elicitores da resposta de resistência em plantas, mostrando-se assim promissores no controle alternativo de fitopatógenos. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar o efeito de extratos aquosos dos fungos e do indutor químico acibenzolar-S-metil (aSm) sobre o crescimento da bactéria *in vitro* e o controle da murcha bacteriana, bem como investigar seu efeito sobre a atividade de determinadas enzimas da planta. O efeito inibitório sobre o patógeno foi avaliado usando diferentes concentrações dos extratos aquosos. A indução de resistência foi estudada em plantas tratadas com o indutor biológico e químico, medindo-se a intensidade de murcha e

determinando-se as alterações de algumas enzimas. Os resultados revelaram que os isolados de *A. blazei* e *L. edodes*, utilizados em diversas diluições, não exerceram efeito inibitório *in vitro*. Em relação à indução de resistência, extratos dos isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei* (15%, v/v) e o aSm (0,05 g/L) promoveram redução significativa na ocorrência de folhas murchas, quando aplicados dois dias antes da inoculação. O aumento na atividade de peroxidase foi verificado em plantas tratadas com extratos de Abl-11, Abl-28 e com suspensão de aSm. A atividade de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foi alterada nas plantas tratadas com extrato de Abl-28 e com o aSm. No entanto, plantas de berinjela tratadas com Abl-11 exibiram um aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase e de polifenoloxidase, enquanto que a atividade de quitinase não foi alterada. Com base nos resultados, ficou evidenciado que o aSm e os isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei* apresentam potencial para induzir resistência em berinjela contra *R. solanacearum*.

Palavras-chave adicionais: murcha bacteriana, proteínas-PR, indutores bióticos.

ABSTRACT

Silva, R.F.; Pascholati, S.F.; Bedendo, I.P. Induction of resistance in eggplants by *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* against *Ralstonia solanacearum*: biochemical aspects and vegetable biomass. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.137-144, 2008

The bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is an important disease for eggplants, which control is difficult. Induction of resistance in plants is a promising method for disease control. Fruiting bodies of *Agaricus blazei* and *Lentinula edodes* have substances that exhibit antibiotic activity or are able of acting as elicitors of resistance in plants. The objectives of the present work were to verify the effect of aqueous extracts from the mushrooms and the plant activator acibenzolar-S-methyl (aSm) on *in vitro* bacterial growth and to control bacterial wilt as well as to investigate the activity of certain enzymes. The inhibitory effect on the pathogen was evaluated by using different concentrations of aqueous extracts. The induced resistance was studied in plants treated with the biological or chemical inducers, by measuring the intensity of wilt and alterations in some defense-related enzymes. The results showed that the isolates

of *A. blazei* and *L. edodes*, used in several dilutions, did not inhibit *in vitro* bacterial growth. The extracts of the isolates Abl-11 and Abl-28 from *A. blazei* (15%, v/v) and aSm (0,05 g/L) caused significant reduction in the occurrence of wilted leaves, when applied two days before inoculation. Plants treated with aSm or aqueous extracts of Abl-11 and Abl-28 exhibited increased peroxidase activity. The chitinase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities did not change in plants treated with Abl-28 and aSm. However, plants treated with Abl-11 exhibited increased phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities, while the chitinase activity was not affected. Based upon the results, it was shown that the aSm and the isolates Abl-11 and Abl-28 of *A. blazei* exhibited a potential to induce resistance in eggplants against *R. solanacearum*.

Additional keywords: bacterial wilt, PR-protein, biotic inducers

Entre as diversas doenças que atacam as solanáceas, a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) é considerada a principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde infecta plantas pertencentes a mais de 50 famílias botânicas (12, 16). Como o controle da bactéria, em condições favoráveis, é difícil, medidas como rotação de cultura com gramíneas (milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e pastagens), plantio em áreas onde não há histórico da doença, isolamento dos focos iniciais da doença e cuidados com a irrigação se tornam necessárias (15). Com relação ao controle químico da murcha bacteriana, este tem apresentado pouco sucesso (16, 28).

No contexto da proteção de plantas, a resistência induzida pode ser visualizada como uma das medidas de controle alternativo. A indução de resistência em plantas vem sendo estudada desde o início do século XX (2). Porém, apenas recentemente, a potencialidade de seu emprego no controle de enfermidades tem recebido o merecido destaque (5, 10, 21). Ela tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento, por exemplo, com fungos, bactérias e elicitores microbianos ou químicos (11, 24).

A resistência induzida é caracterizada pela ativação de mecanismos bioquímicos, que podem envolver a síntese e atividade de peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (4). Dentre os elicitores químicos ou abióticos, destaca-se o acibenzolar-S-metil (aSm), um derivado benzotiazólico, capaz de atuar como análogo funcional do ácido salicílico, o qual possibilita proteção de campo contra um amplo espectro de doenças em diversas espécies cultivadas (10, 17). Entre os diversos agentes bióticos conhecidos, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* têm sido pesquisados como potenciais agentes indutores de resistência para o controle de doenças em plantas (9). Dentre as substâncias presentes no basidioma e no micélio de *L. edodes* e de *A. blazei*, a lentinana, uma glucana obtida a partir de *L. edodes*, protegeu plantas de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* sem apresentar efeito direto sobre a bactéria, indicando que a proteção provavelmente ocorreu através da indução de resistência (25).

A atividade antibacteriana de *L. edodes* foi estudada in vitro por Ishikawa (13), através da técnica de difusão em sobrecamada de agar semi-sólido. Os 35 isolados de *L. edodes* testados mostraram atividade contra diversas espécies de bactérias nocivas ao homem ou patogênicas às plantas, sendo que poucas Gram-negativas e diversas Gram-positivas tiveram seu crescimento inibido.

Di Piero & Pascholati (7) verificaram que o extrato aquoso de um isolado de *A. blazei* reduziu significativamente a severidade da mancha bacteriana em tomateiro, em casa-de-vegetação, obtendo-se uma proteção média de 45%, quando o extrato foi aplicado 5 dias antes da inoculação com o patógeno. Observou-se também um aumento na atividade de β -1,3-glucanase, sugerindo assim a indução de resistência em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a ação dos extratos aquosos de *L. edodes* e de *A. blazei* como indutores de resistência em plantas de berinjela contra a bactéria causadora da murcha e investigar o seu efeito sobre a atividade das enzimas peroxidase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*

Os cogumelos foram produzidos no Departamento de Produção Vegetal (Módulo de Cogumelos), da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu, sendo enviados pela Prof^a Dra. Marli T. A.

Minhoni. Para obtenção dos extratos aquosos dos isolados Le-96/22 e Le-96/17 de *L. edodes* e Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei*, cada grama de pó seco obtido de basidiomas desidratados e moídos foi dissolvida em 14 mL de água destilada. Após 24 h de incubação a 4°C, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum e centrifugada a 20.000g por 25 min. Para os bioensaios realizados em casa-de-vegetação, os extratos brutos foram diluídos a 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). Para os testes realizados in vitro, os extratos aquosos foram filtrados em membrana tipo Millipore (0,2 μ m), sob condições assépticas, sendo posteriormente armazenados em geladeira até serem usados.

Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas

Utilizou-se o isolado Rs84 de *R. solanacearum*, cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa. Para a realização dos ensaios, o isolado foi cultivado no meio de tetrazólio (14) e incubado por 48 h a 28 \pm 2°C. O isolado bacteriano foi preservado em tubos de ensaio contendo o meio nutriente-agar (NA) coberto por óleo mineral esterilizado e em água destilada esterilizada (30), em temperatura ambiente ou na geladeira. Em todos os bioensaios, foi utilizado o híbrido de berinjela Hib. F1 Napolitana, cedido pela empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. As plantas foram produzidas em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo o substrato agrícola Plantmax[®] (Eucatex) e mantidas sob condições de casa-de-vegetação.

Efeito in vitro dos cogumelos sobre *R. solanacearum*

Tubos de ensaio contendo 7 mL de água destilada esterilizada receberam extratos aquosos dos isolados de *L. edodes* e *A. blazei*, obtendo-se concentrações finais de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). O tratamento controle foi representado por tubos contendo somente água. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de suspensão bacteriana em cada tubo, de modo que a concentração final fosse de 10⁸ ufc/mL. O ensaio foi realizado com cinco repetições por tratamento, onde cada tubo representou uma repetição. Os tubos foram mantidos no escuro a 28 \pm 2°C por 24 h. Alíquotas de 300 μ L de cada tubo foram pipetadas em placas de Petri contendo o meio nutriente-agar (NA) e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram novamente mantidas no escuro a 28 \pm 2°C, por 48 h. Para avaliação, 20 mL de água destilada foram adicionados a cada placa e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (550 nm). Este ensaio foi realizado em duplicata.

Proteção de plantas de berinjela em casa-de-vegetação

Os extratos aquosos dos cogumelos, a solução de acibenzolar-S-metil (0,05 g/L; Bion[®], Syngenta) e água foram aspergidos sobre as plantas até o ponto de escorrimento e, após dois dias, a bactéria foi inoculada. O método de inoculação consistiu de ferimento no caule através da introdução de um alfinete entomológico número 3, que transpassou uma gota de 10 μ L da suspensão bacteriana de 10⁸ ufc/mL (equivalente a absorbância de 0,1 a 550 nm), que estava depositada na axila foliar (19). Foram realizadas 10 repetições/tratamento, onde cada planta representou uma repetição. O delineamento experimental foi do tipo completamente casualizado. As avaliações foram feitas no 5^o e 10^o dias após a inoculação, com base na porcentagem de folhas murchas e nos pesos das massas fresca e seca das plantas. Os tratamentos conduzidos estão apresentados na Tabela 1. Este ensaio foi realizado em duplicata.

Efeito de extratos fúngicos sobre a atividade de enzimas

As amostras consistiram de todas as folhas de cada planta coletadas aos 0, 1, 2, 3, 4, 7 e 12 dias após os tratamentos (Tabela 2). Em cada

Tabela 1. Tratamentos com acibenzolar-S-metil (aSm) e com os isolados dos cogumelos *Agaricus blazei* (Abl-11 e Abl-28) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), utilizados no experimento em casa-de-vegetação. As plantas de berinjela foram inoculadas com *R. solanacearum* (Rs84) dois dias depois de tratadas.

| Tratamento | Agente aplicado | Concentração | Inoculação |
|------------|-----------------|--------------|------------|
| T 1 | Água | - | Água |
| T 2 | Água | - | Rs84 |
| T 3 | Abl-11 | 5% (v/v) | Rs84 |
| T 4 | Abl-11 | 10% (v/v) | Rs84 |
| T 5 | Abl-11 | 15% (v/v) | Rs84 |
| T 6 | Abl-11 | 20% (v/v) | Rs84 |
| T 7 | Le-96/17 | 5% (v/v) | Rs84 |
| T 8 | Le-96/17 | 10% (v/v) | Rs84 |
| T 9 | Le-96/17 | 15% (v/v) | Rs84 |
| T 10 | Le-96/17 | 20% (v/v) | Rs84 |
| T 11 | Le-96/22 | 5% (v/v) | Rs84 |
| T 12 | Le-96/22 | 10% (v/v) | Rs84 |
| T 13 | Le-96/22 | 15% (v/v) | Rs84 |
| T 14 | Le-96/22 | 20% (v/v) | Rs84 |
| T 15 | Abl-28 | 5% (v/v) | Rs84 |
| T 16 | Abl-28 | 10% (v/v) | Rs84 |
| T 17 | Abl-28 | 15% (v/v) | Rs84 |
| T 18 | Abl-28 | 20% (v/v) | Rs84 |
| T 19 | aSm | 0,05 g/L | Rs84 |

Tabela 2. Tratamentos com acibenzolar-S-metil (aSm) e com os isolados do cogumelo *Agaricus blazei* (Abl-11 e Abl-28), utilizados no experimento em casa-de-vegetação, envolvendo a atividade de enzimas. As plantas de berinjela foram inoculadas com *R. solanacearum* (Rs84) dois dias depois de tratadas.

| Tratamento | Agente aplicado | Concentração | Inoculação |
|------------|-----------------|--------------|------------|
| T 1 | Água | - | Água |
| T 2 | Água | - | Rs84 |
| T 3 | aSm | 0,05 g/L | Água |
| T 4 | aSm | 0,05 g/L | Rs84 |
| T 5 | Abl-28 | 15% (v/v) | Água |
| T 6 | Abl-28 | 15% (v/v) | Rs84 |
| T 7 | Abl-11 | 15% (v/v) | Água |
| T 8 | Abl-11 | 15% (v/v) | Rs84 |

tratamento foram utilizadas quatro repetições, onde cada planta representou uma repetição. As amostras coletadas foram maceradas e homogeneizadas em 4 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e centrifugadas a 20000g/25 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em congelador a -20°C, para avaliação do teor de proteínas totais e atividade enzimática.

Peroxidase (E.C. 1.11.1.7.) – a atividade foi determinada por método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (18). A reação foi realizada com 0,1 mL do extrato proteico misturado com 2,9 mL de uma solução com 250 mL de guaiacol e 306 mL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). Como referência, utilizou-se uma cubeta com 3 mL da solução contendo guaiacol e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato. A atividade da peroxidase foi expressa em unidades

de absorvância / min / mg proteína (U.A./ min / mg prot).

Quitinase (E.C. 3.2.1.14) - para avaliar a atividade utilizou-se a metodologia descrita por Wirth & Wolf (31), na qual ocorre a liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV). Foram utilizados 200 µL do extrato proteico misturados com 600 µL de tampão de extração (acetato de sódio 10 mM, pH 5,0) e 200 µL do substrato CM-Chitin-RBV (2,0 mg.mL⁻¹). Estas amostras foram incubadas a 40°C em banho-maria por 20 min, paralisando-se a reação com a adição de 200 µL de HCl 1,0 M. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 min a 5000g, procedendo-se então a leitura do sobrenadante em absorvância de 550 nm, utilizando-se uma cubeta de referência com 800 µL de tampão de extração + 200 µL do substrato CM-Chitin-RBV + 200 µL de HCl 1,0 M. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância/ min/ mg de proteína (U.A./ min / mg prot).

Polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1) – a atividade foi determinada de acordo com Duangmal & Apenten (8), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. O substrato utilizado foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). Para a reação, que ocorreu a 30°C, 900 µL do substrato foram misturados com 100 µL do extrato proteico. As leituras foram efetuadas a cada 10 s a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorvância de 0,001 por min de reação por mg de proteína total.

Fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) – a atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (29). A reação continha 100 ml do extrato proteico misturado com 400 mL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e com 500 ml de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8), a qual foi incubada por 2 h a 40°C. A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (100 mL do extrato proteico + 900 mL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A atividade enzimática foi expressa em mg de ácido trans-cinâmico/ min / mg de proteína, utilizando-se uma curva padrão para o ácido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito in vitro dos cogumelos sobre *Ralstonia solanacearum*

O aSm e os isolados de *L. edodes* e de *A. blazei* utilizados nos testes in vitro não inibiram o crescimento da bactéria, sendo que em alguns tratamentos ocorreu até um estímulo ao crescimento (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por Di Piero & Pascholati (7), onde os isolados de *L. edodes* não apresentaram efeito direto sobre *Xanthomonas vesicatoria* e os isolados de *A. blazei* chegaram a estimular o crescimento bacteriano in vitro. Contrariamente, Pacumbaba et al. (23), utilizando um isolado de *L. edodes*, obtiveram inibição do crescimento in vitro de diversas bactérias, inclusive de *R. solanacearum*. Outros compostos, como o extrato cítrico, também já foram testados in vitro visando à inibição do crescimento de bactérias, mostrando ter efeito na redução da concentração das células de *R. solanacearum* (20).

Proteção de plantas de berinjela em casa-de-vegetação

De maneira geral, o extrato aquoso do isolado Abl-28, nas concentrações utilizadas, foi aquele que promoveu a menor ocorrência de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos (Figura 1). Os tratamentos com acibenzolar-S-metil e com os demais extratos aquosos

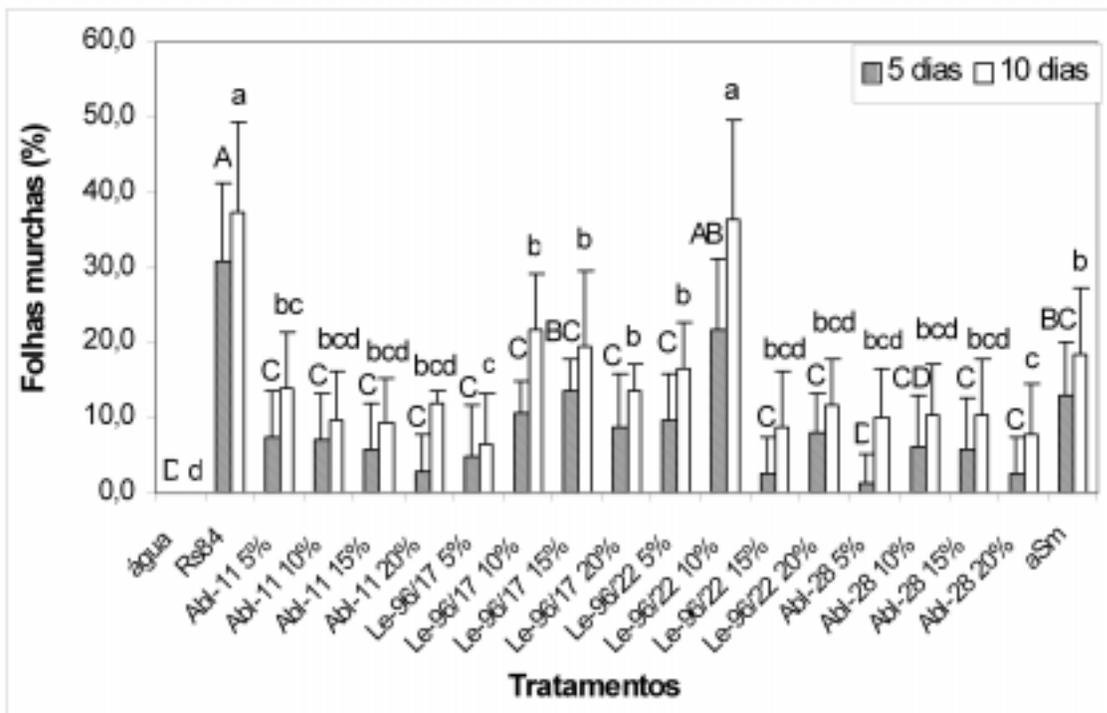


Figura 1. Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-11 e Abl-28) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre a ocorrência de folhas murchas em plantas de berinjela, causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs84). As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se aos tratamentos avaliados aos 5 dias após a inoculação e as letras minúsculas referem-se aos tratamentos avaliados aos 10 dias após a inoculação. Os tratamentos controle são representados pela água e Rs84.

de cogumelos também proporcionaram diminuição na ocorrência de folhas murchas, quando comparados com o tratamento Rs84. Quanto ao efeito dos tratamentos sobre o peso das massas fresca e seca das plantas, os extratos aquosos de Abl-11 e de Le-96/17 5% (v/v) apresentaram resultados semelhantes àqueles obtidos para o tratamento controle representado pela água (dados não mostrados).

O efeito protetor de Abl-28 e de aSm, com base na diminuição da ocorrência de folhas murchas em berinjela, também foi observado em trabalho semelhante, realizado por Di Piero & Pascholati (7), no patossistema tomate / *Xanthomonas vesicatoria*. Neste trabalho, o extrato aquoso de Abl-28 e o acibenzolar-S-metil reduziram a severidade da bacteriose. Além disso, a quantidade de inóculo bacteriano e o intervalo de tempo entre a aplicação dos tratamentos e a inoculação com a bactéria tiveram influência na proteção das plantas de tomate.

Determinação da atividade enzimática

Quando analisamos apenas o efeito dos tratamentos indutores sobre plantas de berinjela, sem a inoculação da bactéria, podemos observar que a atividade de peroxidase e quitinase do tratamento aSm diferiu significativamente do tratamento Água a partir do 3º dia após o tratamento (Figuras 2 A e 2 D). Já o tratamento Abl-28 diferiu do tratamento Água apenas no 12º após o tratamento (Figura 2 B e 2 E). Na atividade de fenilalanina amônia-liase, ocorreram diferenças significativas entre o tratamento Abl-28 e o tratamento Água no 3º, 7º e 12º dias após o tratamento (Figura 3 B), sendo que para os tratamentos aSm e Abl-11 a elevação da atividade enzimática foi observada somente no 12º e no 7º dia após o tratamento, respectivamente (Figuras 3 A e 3 C). Para polifenoloxidase foi observado que sua atividade nos tratamentos aSm e Abl-28 diferiram do tratamento Água somente no 12º dia após o tratamento (Figuras 3 D e 3 E).

Por outro lado, quando comparamos os tratamentos com a inoculação da bactéria, a atividade de peroxidase aumentou nas plantas tratadas com aSm e Abl-11 no 7º e no 12º dia após o tratamento, respectivamente, e com Abl-28 ocorreram diferenças significativas no 7º e 12º dias após o tratamento, em relação ao tratamento água-Rs84 (Figuras 2 A, 2 B e 2 C).

As análises bioquímicas revelaram que a quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não são bons marcadores de resistência para o patossistema em questão, visto que os tratamentos não mostraram diferenças significativas em relação ao tratamento água-Rs84 (Figura 2 D, 2 E e 2 F), exceto o tratamento Abl-11, que provocou elevação na atividade de fenilalanina amônia-liase no 7º e 12º dias após o tratamento e de polifenoloxidase, no 7º dia após o tratamento (Figura 3 C e 3 F).

Essa redução na atividade de algumas enzimas também foi verificada por Osswald et al (22) que, estudando o patossistema sorgo - *Colletotrichum graminicola*, observaram que apesar da indução na produção de fitoalexinas ser diretamente proporcional ao aumento na dose de aSm, ocorreu uma redução na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

Com relação aos mecanismos de ação envolvidos na redução da murcha bacteriana, o indutor acibenzolar-S-metil e o extrato aquoso Abl-28 de *A. blazei* provocaram uma elevação na atividade de peroxidase no 7º dia após o tratamento, sendo mais eficientes que o fitopatógeno em alterar a atividade da enzima. Além disso, as plantas tratadas com Abl-28 continuaram exibindo maior atividade no 12º dia após o tratamento. Essa maior atividade enzimática nos tratamentos aSm e Abl-28 coincidiu com a diminuição da ocorrência de folhas murchas e com o aumento da quantidade de proteínas (dados não mostrados) das plantas tratadas com os mesmos. As peroxidases participam de

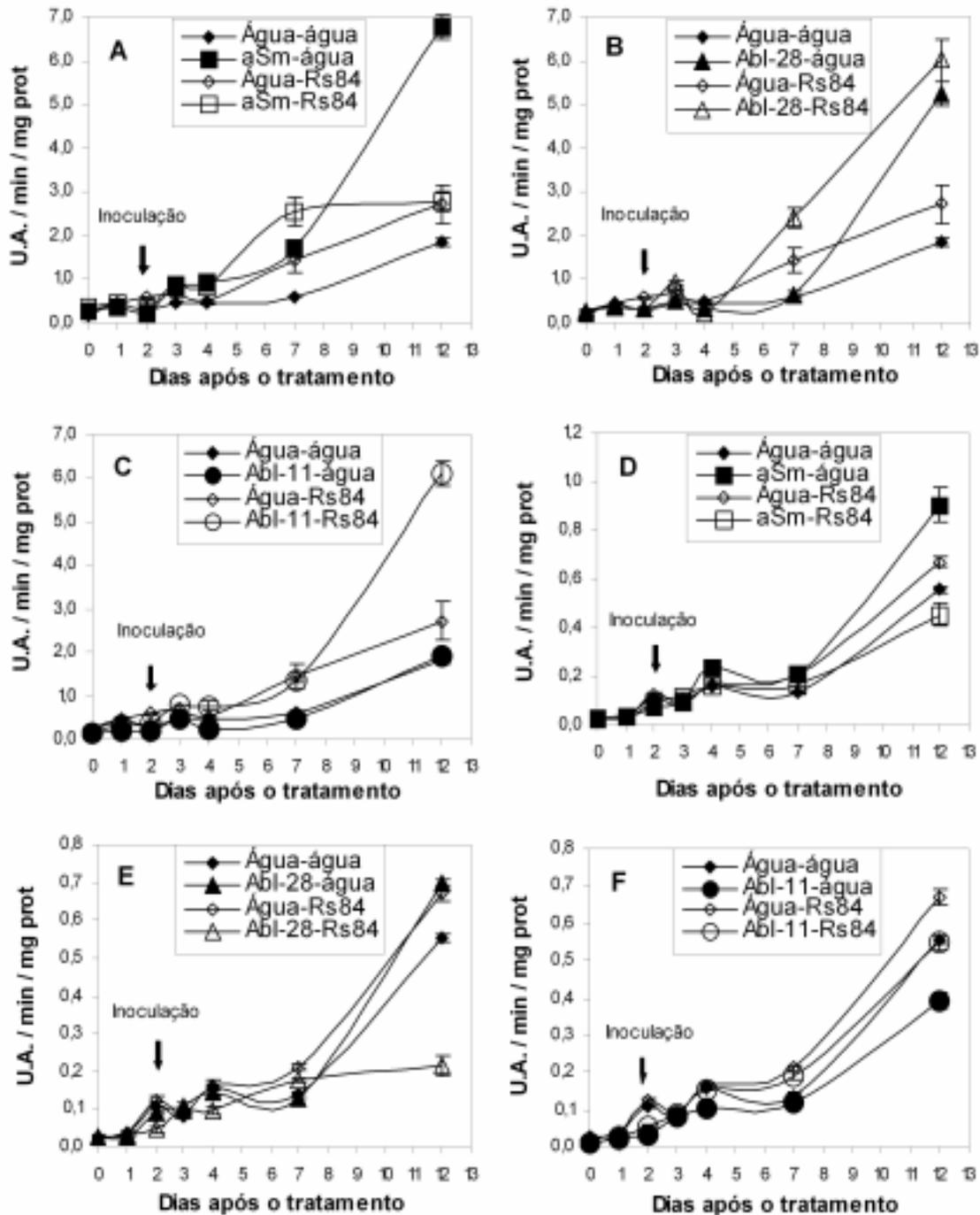


Figura 2. Atividade de peroxidase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-28 (B) e Abl-11 (C) e atividade de quitinase após o tratamento com aSm (D), Abl-28 (E) e Abl-11 (F), nas folhas de berinjela. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs84). Barras representam à média \pm desvio padrão.

diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos e defesa de patógenos, entre outras (3). Desse modo, os níveis de peroxidase encontrados nas folhas de berinjela tratadas com aSm e com Abl-28 (5 dias após a inoculação com a bactéria) podem ter contribuído na diminuição da ocorrência de folhas murchas. Estudando a ação de aSm na indução de resistência de plantas de tomate contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Soylu et al. (27) demonstraram que o aSm reduziu a severidade da bactéria em 75% aos 7 dias após a inoculação, mantendo o mesmo nível de controle até os

14 dias após a inoculação. Além disso, ocorreu uma maior atividade de quitinase aos 2, 3, 5 e 7 dias após a inoculação com a bactéria e uma maior atividade de peroxidase aos 5 dias após a inoculação com a bactéria nas plantas tratadas com aSm. Este aumento foi correlacionado com a expressão de resistência induzida nas plantas de tomate tratadas com aSm. Quando este mesmo indutor foi utilizado visando o controle de *Ralstonia solanacearum* em três cultivares de tomateiro, ocorreu uma redução significativa do progresso da doença (1).

Por sua vez, o isolado Abl-11 de *A. blazei* proporcionou aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase,

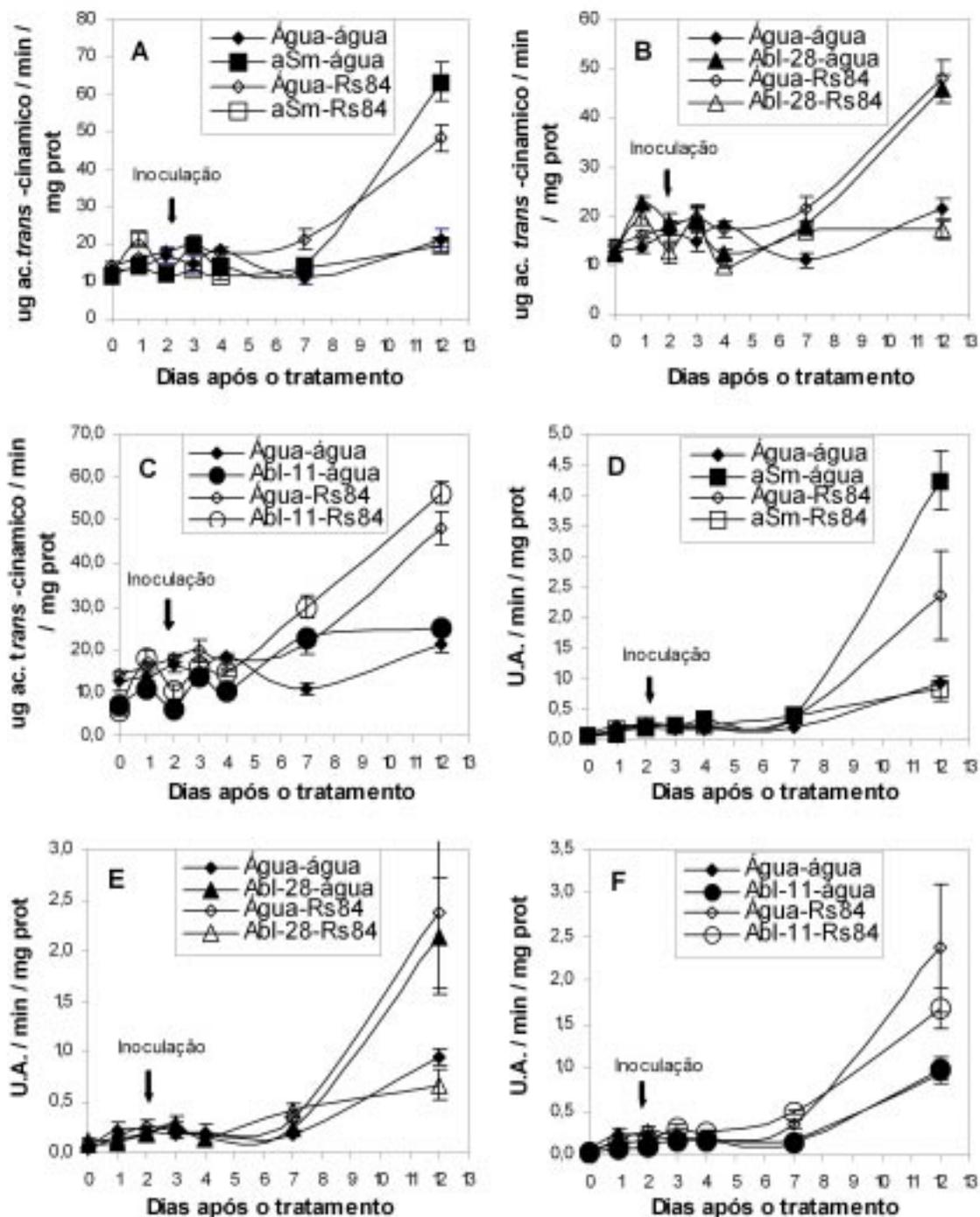


Figura 3. Atividade de fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-28 (B) e Abl-11 (C) e atividade de polifenoloxidase após o tratamento com aSm (D), Abl-28 (E) e Abl-11 (F), nas folhas de berinjela. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs84). Barras representam à média \pm desvio padrão.

demonstrando que a diminuição na ocorrência de folhas murchas pode estar relacionada com a ação deste cogumelo nas plantas de berinjela. O isolado Pf1 de *Pseudomonas fluorescens* foi eficiente em reduzir a incidência de tombamento em tomate e pimentão em casa-de-vegetação e no campo, chegando também a induzir o aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase nas plantas de tomate e pimentão pretratadas com Pf1 e posteriormente desafiadas com *Pythium aphanidermatum* (26).

Di Piero (6) investigou o potencial de *L. edodes* e *A. blazei* no controle de doenças em pepino, maracujá e tomate, verificando que

estes cogumelos possuem substâncias elicitoras de respostas de defesa nas plantas, podendo assim auxiliar no controle de fitopatógenos. No presente trabalho, os extratos aquosos de basidiocarpo dos isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei* também demonstraram potencial para diminuir a murcha bacteriana em berinjela. Além disso, em função da ausência de ação direta sobre o patógeno in vitro e pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas de berinjela, sugere-se que os cogumelos atuaram induzindo resistência nas plantas de berinjela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo, J.S.P.; Gonçalves, K.S.; Oliveira, B.C.; Ribeiro, R.L.D.; Polidoro, J.C. Efeito do acibenzolar-S-metil sobre a murcha-bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.1, p.5-8, 2005.
2. Araújo, J.S.P.; Robbs, C.F.; Ribeiro, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte 1. In: Luz, W.C.; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M.; Picinini, E.C. (Eds.). *Revisão anual de patologia de plantas*, Passo Fundo: RAPP, 2003. v.11, p.107-131.
3. Campos, A.D.; Ferreira, A.G.; Hampe, M.M.V.; Antunes, I.F.; Brancão, N.; Silveira, E.P.; Osório, V.A.; Augustin, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.39, n.7, p.637-643, 2004.
4. Cavalcanti, L.S.; Brunelli, K.R.; Stangarlin, J.R. Aspectos moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap.4, p.81-124.
5. Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: Fealq, 2005. 263p.
6. Di Piero, R.M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. 2003. 157p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
7. Di Piero, R.M.; Pascholati, S.F. Efeitos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.30, n.1, p.57-62, 2004.
8. Duangmal, K.; Apenten, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, United Kingdom, v.64, p.351-359, 1999.
9. Eira, A.F.; Kaneno, R.; Rodrigues Filho, E.; Barbisan, L.F.; Pascholati, S.F.; Di Piero, R.M.; Salvadori, D.M.F.; Lima, P.L.A.; Ribeiro, L.R. Farming technology, biochemistry characterization, and protective effects of culinary-medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. and *Lentinus edodes* (Berk.) Singer: Five years of research in Brazil. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, New York, v.7, p.281-299, 2005.
10. Gorlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K.H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, Baltimore, v.8, n.4, p.629-643, 1996.
11. Hammerschmidt, R.; Kuae, J.; Van Loon, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.01-06, 2001.
12. Hayward, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.29, p.65-87, 1991.
13. Ishikawa, N.K.; Kasuya, M.C.M.; Vanetti, M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.32, p.206-210, 2001.
14. Kelman, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, Lancaster, v.44, p.693-695, 1954.
15. Kurozawa, C.; Pavan, M.A. Doenças do tomateiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de fitopatologia*. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, p.607-626.
16. Lopes, C.A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: *Taller sobre enfermidades bacterianas dela papa*, Brasília, DF: EMBRAPA, CNPH, 1994. p.17-22.
17. Louws, F.J.; Wilson, M.; Campbell, H.L. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, St. Paul, v.85, n.5, p.481-488, 2001.
18. Lusso, M.F.G.; Pascholati, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.
19. Morgado, H.S.; Lopes, C.A.; Takatsu, A. Métodos para avaliação de resistência à murcha bacteriana em berinjela. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.29, n.2, p.237-245, 1994.
20. Motoyama, M.N.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Fiori, A.C.F.; Scapim, C.A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v.25, n.2, p.509-512, 2003.
21. Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.19-28, 2001.
22. Osswald, W.F.; Stangarlin, J.R.; Nicholson, R.L.; Brummer, M.; Wulff, N.A.; Di Piero, R.M.; Piccinin, E.; Di Ciero, L.; Hoto, F.V.; Pascholati, S.F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sblincolum*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.30, n.4, p.415-420, 2004.
23. Pacumbaba, R.P.; Beyl, C.A.; Pacumbaba Jr., R.O. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. *Plant Disease*, St. Paul, v.83, n.1, p.20-23, 1999.
24. Pascholati, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI?. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.29, n.1, p.115-116, 2003.
25. Piccinin, E. Potencial de preparações do cogumelo comestível "shiitake" (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo. 2000. 162p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
26. Ramamoorthy, V.; Raguchander, T.; Samiyappan, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.108, p.429-441, 2002.
27. Soylu, S.; Baysal, O.; Soylu, E.M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, Amsterdam, v.165, p.1069-1075, 2003.
28. Takatsu, A.; Lopes, C.A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v.15, p.170-177, 1997.
29. Umeha, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica*, Israel, v.34, n.1, p.68-71, 2006.
30. Wakimoto, S.; Utatsu, K.; Matsuo, N.; Hayashi, N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. *Annals of Phytopathology Society of Japan*, Tokyo, v.48, p.620-627, 1982.
31. Wirth, S.J.; Wolf, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v.12, n.3-4, p.197-205, 1990.