

Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*

Ricardo F. Silva, Sérgio F. Pascholati & Ivan P. Bedendo

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, Universidade de São Paulo, Cx. Postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil, e-mail: rferrari_silva@yahoo.com.br; sfpascho@esalq.usp.br; ipbedend@esalq.usp.br

Autor para correspondência: Ivan Paulo Bedendo

SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. & BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira 32:189-196. 2007.

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* e do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da murcha bacteriana em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), bem como investigar o modo de ação destes produtos na atividade protetora, através de alterações na atividade de determinadas enzimas. Extratos aquosos dos cogumelos e o ASM foram testados na inibição do crescimento da bactéria *in vitro*. Em casa-de-vegetação, plantas foram tratadas com diferentes doses dos extratos e com ASM (0,05 g/L), dois dias antes da inoculação. As avaliações foram efetuadas com base na severidade da doença e determinação da atividade de algumas enzimas. Os isolados de *A. blazei* e *L. edodes*, bem como o ASM, não exerceram efeito inibitório direto no crescimento da bactéria. Quanto à indução de resistência, o isolado Le-96/17 de *L. edodes* na concentração de 10 % (v/v) e o ASM reduziram significativamente a ocorrência de murcha. As atividades de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foram alteradas para a maioria dos tratamentos, porém foi constatado um aumento na atividade de quitinase nas plantas tratadas com ASM. Para a peroxidase, os tratamentos ASM, Abl-26 e Le-96/17 ocasionaram aumentos na atividade da enzima e, com base nos resultados, o cogumelo *L. edodes* e o ASM apresentam potencial para reduzir a murcha bacteriana provavelmente através da indução de resistência.

Palavras-chave adicionais: murcha bacteriana, proteínas-RP, resistência induzida.

ABSTRACT

Induction of resistance in tomato plants by aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* against *Ralstonia solanacearum*

This work deals with the effect of aqueous extracts from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* and the inducer of resistance acibenzolar-S-methyl (ASM) on the control of bacterial wilt in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), as well as investigating changes in enzyme activities. Aqueous extracts of the mushrooms and ASM were tested for inhibition of bacterial growth *in vitro*. Plants were treated with different concentrations of the extracts and with ASM two days before inoculation in greenhouse conditions. The evaluations were based upon disease severity and activity of some enzymes. In general, the isolates of *A. blazei* and *L. edodes*, as well as ASM, did not inhibit *in vitro* bacterial growth. In treated plants, the isolate Le-96/17 10 % (v/v) of *L. edodes* and ASM significantly reduced bacterial wilt. Chitinase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities were not changed for most of the treatments; however, increased chitinase activity was verified in plants treated with ASM. The ASM, Abl-26 and Le-96/17 treatments increased peroxidase activity in plants and, based upon the results, *L. edodes* mushroom and ASM both exhibit potential to reduce bacterial wilt in tomato plants, probably by inducing resistance.

Additional keywords: bacterial wilt, PR-proteins, induced resistance.

INTRODUÇÃO

As bactérias vêm assumindo importância crescente entre os patógenos que afetam espécies de plantas de expressão econômica na agricultura brasileira, causando elevadas perdas, embora não existam estatísticas precisas (Araújo *et al.*, 2003; Kimura & Carmo, 1995; Lopes & Quezado-Soares, 1997; Romeiro, 1995). Dentre as doenças que afetam a cultura do tomateiro, a murcha causada por

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* tem promovido perdas relevantes em culturas instaladas nas diversas regiões brasileiras. A doença tem sido assinalada desde o Estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul e, dependendo das condições ambientais, os prejuízos podem ser totais (Batista & Guedes, 1981). Pelo fato deste patógeno atuar no sistema vascular, ser habitante do solo e estar associado a um grande número de espécies botânicas, o controle da doença se torna extremamente difícil (Lopes & Reifschneider, 1999).

Novas alternativas de controle têm sido estudadas para promover a redução da severidade de doenças em diversas culturas, sendo a indução de resistência um método

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. ESALQ, Universidade de São Paulo. Piracicaba SP. 2007.

potencial. Esta indução pode ser efetiva contra diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos, sendo ativada por indutores bióticos ou abióticos (Baysal *et al.*, 2003; Bonaldo *et al.*, 2005; Ryals *et al.*, 1996). O agente indutor não atua diretamente sobre o patógeno ou é transformado em algum agente antimicrobiano, mas ele sensibiliza a planta a ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (Conrath *et al.*, 2002). Esses mecanismos podem envolver enzimas como peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (Cavalcanti *et al.*, 2005).

Dentre os indutores abióticos, o ácido salicílico (AS) e seus análogos são os mais importantes. Um exemplo é o acibenzolar-S-metil (ASM), que tem se revelado um potente ativador de resistência sistêmica adquirida (RSA), conferindo proteção em condições de campo contra um amplo espectro de patógenos de diversas espécies de plantas cultivadas (Gorlach *et al.*, 1996). Os agentes bióticos, sejam estes microrganismos viáveis ou inativados, podem também ativar mecanismos de defesa da planta (Stangarlin & Pascholati, 1994). Entre estes agentes, os cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* Murrill apresentam substâncias no basidiocarpo e no micélio com potencial para o controle de fitopatógenos. Assim, Pacumbaba *et al.* (1999) demonstraram que o lixiviado micelial de *L. edodes* impediu a ocorrência de murcha bacteriana em tomateiro provocada por *R. solanacearum* e murcha de feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, quando aplicado em substrato previamente infestado com as bactérias. Di Piero (2003) verificou a proteção de plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin *et al.* utilizando extratos de um isolado de *A. blazei*, que reduziu significativamente a severidade da bacteriose quando aplicado a 10 % (v/v) e 5 dias antes da inoculação das plantas. Trabalhando com o filtrado da cultura de *L. edodes*, Komemushi *et al.* (1995) observaram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e sobre fungos. Posteriormente, foi isolado um composto antibacteriano formado por um álcool β -fenetil e lentinamicin, que estava presente em culturas líquidas de micélio (Komemushi *et al.*, 1996).

Em razão da importância da murcha para a cultura do tomateiro e do potencial efeito de extratos de *L. edodes* e *A. blazei* sobre a indução de resistência, o presente trabalho teve por objetivos avaliar o efeito indutor de extratos aquosos dos cogumelos e do ASM na resistência do tomateiro à murcha bacteriana e determinar a atividade das enzimas peroxidase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, como respostas de defesa.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas

Utilizou-se o isolado Rs47 de *R. solanacearum*, obtido junto à empresa Sakata Seeds Sudamerica Ltda. Para a realização dos ensaios, o isolado foi cultivado no

meio de tetrazólio (Kelman, 1954), com incubação por 48 h a 28 ± 2 °C. O isolado bacteriano foi preservado em tubos de ensaio contendo o meio nutriente-ágar (NA) coberto por óleo mineral esterilizado e em água destilada esterilizada (Wakimoto *et al.*, 1982), em temperatura ambiente ou na geladeira. Sementes do híbrido de tomate Hib. F1 Carmen, cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda, foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células contendo o substrato agrícola Plantmax® (Eucatex). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com média de temperatura dia/noite de 30/22 °C, umidade relativa ≥ 60 % e fotoperíodo de aproximadamente 12 horas.

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 Agrônômicas – UNESP/Botucatu. Para obtenção do extrato bruto dos isolados Le-96/22 e Le-96/17 de *L. edodes* e Abl-26 e Abl-29 de *A. blazei*, o pó seco de basidiocarpo recebeu 14 mL de água destilada por grama. Após 24 h de incubação a 4 °C, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum e centrifugada a 20.000 g por 25 min (Di Piero, 2003). Para os testes realizados *in vitro*, os extratos aquosos foram esterilizados por filtração (diâmetro do poro = 0,2 μ m), sob condições assépticas, sendo posteriormente armazenados a 4 °C até serem usados.

Efeito *in vitro* dos extratos aquosos dos cogumelos e do ASM sobre *R. solanacearum*

Tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada receberam ASM (0,05 g/L; Bion®, Syngenta) e os extratos aquosos dos isolados de *L. edodes* (Le-96/17 e Le-96/22) e *A. blazei* (Abl-26 e Abl-29), 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 10^8 ufc/mL. O ensaio foi conduzido com cinco repetições por tratamento, onde cada tubo representou uma repetição. Os tubos foram mantidos no escuro a 28 ± 2 °C por 24 h sendo que, posteriormente, alíquotas de 300 μ L de cada tubo foram pipetadas em placas de Petri contendo o meio nutriente-ágar (NA) e espalhadas por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram novamente mantidas no escuro a 28 ± 2 °C, por 48 h. A avaliação dos resultados foi efetuada com a suspensão bacteriana obtida em cada placa, pela adição de 20 mL de água destilada, através de leitura em espectrofotômetro a 550 nm, obtendo-se o valor da unidade de absorvância (U.A.) por mL. Este ensaio foi realizado duas vezes.

Proteção de plantas de tomate em casa-de-vegetação

Plantas de tomate com 20 dias após a semeadura foram tratadas, ainda na bandeja, com os extratos aquosos dos cogumelos, com o ASM ou com água, através da rega do substrato agrícola Plantmax® (10 mL/planta). Após dois

dias do tratamento, as plantas foram retiradas da bandeja e sacudidas para retirar o substrato aderido as raízes, sendo então realizada a inoculação da bactéria através do corte das raízes com tesoura e imersão destas raízes por 10 minutos em suspensão bacteriana calibrada para 10^8 ufc/mL (Lopes, 1981). As plantas foram transplantadas para vasos contendo um novo substrato esterilizado, composto de solo, esterco de curral e areia (1:1:1) e mantidas em casa-de-vegetação com temperatura dia/noite de 33/24 °C, umidade relativa ≥ 70 % e fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. Foram realizadas 10 repetições/tratamento, onde cada planta representou uma repetição. O delineamento experimental foi o completamente casualizado. As avaliações foram feitas no 5º e 10º dias após a inoculação, com base na porcentagem de folhas murchas (número de folhas murchas x 100 / número total de folhas da planta) e peso da matéria fresca e seca. Os tratamentos usados no experimento foram: plantas tratadas com água (T1 e T2); plantas tratadas com ASM na concentração de 0,005 g/L (T3); plantas tratadas com Abl-29 na concentração de 10 % e 20 % (T4 e T5); plantas tratadas com Abl-26 na concentração de 10 % e 20 % (T6 e T7); plantas tratadas com Le-96/17 na concentração de 10 % e 20 % (T8 e T9) e plantas tratadas com Le-96/22 na concentração de 10 % e 20 % (T10 e T11).

Determinação da atividade enzimática

As plantas de tomate foram tratadas com os extratos aquosos dos cogumelos e com ASM, bem como inoculadas com a bactéria *R. solanacearum* de forma idêntica àquela descrita no item anterior. Em cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, onde cada planta representou uma repetição, em um delineamento inteiramente casualizado. As amostras consistiram da coleta de todas as folhas de cada planta aos 0, 1, 2, 3, 4, 7 e 12 dias após os tratamentos. Os tratamentos utilizados foram: plantas tratadas com água (T1 e T2); plantas tratadas com ASM na concentração de 0,005 g/L (T3 e T4); plantas tratadas com Abl-26 na concentração de 10 % (T5 e T6) e plantas tratadas com Le-96/17 na concentração de 10 % (T7 e T8), sendo que as plantas dos tratamentos pares foram inoculadas com *R. solanacearum* dois dias após os tratamentos.

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 (Bradford, 1976) e atividades enzimáticas.

A atividade de peroxidase foi determinada por método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Lusso & Pascholati, 1999). A reação foi realizada com 0,1 mL do extrato proteico misturado com 2,9 mL de uma solução com 250 μ L de guaiacol e 306 μ L de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa em unidades de absorvância / min / mg proteína (U.A./ min /mg prot). Para se avaliar a

atividade de quitinases utilizou-se a metodologia descrita por Wirth & Wolf (1990), na qual ocorre a liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV). Foram utilizados 200 μ L do extrato proteico misturados com 600 μ L de tampão de extração (acetato de sódio 10 mM, pH 5,0) e 200 μ L 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 μ L 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. Os resultados foram expressos em U.A. / min / mg de proteína.

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Duangmal & Apenten (1999), 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 μ L do substrato foram misturados com 100 μ L do extrato proteico. As leituras foram feitas a cada 10 s a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a 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.

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Umeha, 2006). A reação continha 100 μ L do extrato protéico misturado com 400 μ L do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e com 500 μ L 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 (controle = 100 μ L do extrato proteico + 900 μ L de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A atividade enzimática foi expressa em μ g de ácido *trans*-cinâmico /min /mg de proteína, utilizando uma curva padrão para o ácido.

RESULTADOS

Efeito *in vitro* e de proteção de tomateiro em casa-de-vegetação contra *R. solanacearum* utilizando os extratos dos cogumelos e o ASM

Nos testes *in vitro* realizados para *R. solanacearum*, o ASM e os extratos aquosos de *A. blazei* ou *L. edodes* não promoveram inibição significativa do crescimento da bactéria (dados não mostrados).

O experimento realizado em casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum*, utilizando o indutor acibenzolar-S-metil (ASM) e os extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*, mostrou que o extrato aquoso do isolado Le-96/17 a 10% (v/v) e o ASM proporcionaram menores porcentagens de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos.

Estes dois tratamentos reduziram a severidade da murcha bacteriana em 66,00 % e 53,68 % respectivamente, em relação a testemunha tratada com água e inoculada com a bactéria (Tabela 1). Dentre os isolados de *A. blazei*, Abl-26 10 % (v/v) foi o que proporcionou menor porcentagem de folhas murchas. Quanto ao efeito dos tratamentos sobre o peso da matéria fresca e seca, as plantas tratadas com o isolado Le-96/17 a 10 % (v/v) e com água (testemunha não-inoculada) tiveram maior peso em relação às plantas tratadas nos demais tratamentos (Tabela 1).

Efeito dos indutores sobre a atividade enzimática

No ensaio envolvendo a atividade de peroxidases, as plantas tratadas com ASM e Abl-26 e inoculadas com a bactéria tiveram um aumento na atividade enzimática no 7º e 12º dia após o tratamento, respectivamente (Figuras 1 A e 1 B). No caso do tratamento com o extrato de Le-96/17, houve um aumento significativo na atividade de peroxidase nas plantas inoculadas com bactéria apenas no 3º dia após o tratamento, ou seja, um dia após a inoculação (Figura 1 C). A atividade de peroxidase aumentou significativamente nas plantas não inoculadas com a bactéria e tratadas com ASM, Abl-26 e Le-96/17, no 3º, 7º e 12º dias após o tratamento, em relação ao tratamento água (Figura 1 A-C).

Quanto à quitinase, o tratamento de plantas com ASM e inoculadas com RS47 provocou aumento significativo na atividade enzimática no 7º dia após o tratamento (Figura 2 A). Nos tratamentos conduzidos com os extratos de Abl 26 e Le-96/17 e inoculados com a bactéria foi verificada menor atividade desta enzima em todas as avaliações em relação às plantas tratadas com água e inoculadas com a bactéria, exceto para o material amostrado no 3º dia após o tratamento com Le-96/17 (Figura 2 C).

A atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase

e polifenoloxidase em plantas tratadas com os indutores e inoculadas com a bactéria foram menores do que nas plantas tratadas com água e inoculadas com o patógeno (Figuras 3 e 4). No entanto, nas plantas não inoculadas, a atividade destas enzimas foi maior nas plantas tratadas pelos indutores ao 3º, 7º e 12º dias após o tratamento (Figuras 3 e 4).

DISCUSSÃO

Nos testes conduzidos *in vitro*, os resultados obtidos foram semelhantes àqueles obtidos por Di Piero & Pascholati (2004a), onde os isolados de *L. edodes* utilizados não apresentaram efeito direto *in vitro* e os isolados de *A. blazei* chegaram até a estimular o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*. Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que isolados destes cogumelos podem inibir o crescimento de patógenos. No estudo do efeito inibitório *in vitro* de quatro linhagens de *L. edodes* (Le 10, 46, K2, Assai) sobre algumas espécies de fungos filamentosos de importância agrícola como *Helminthosporium euphorbiae* Hansf., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Phomopsis sojae* Lehman e sobre o sorotipo Alagoas do vírus da estomatite vesicular (VSA), Sasaki *et al.* (2001) observaram que as linhagens K2 e Le10 mostraram-se antagônicas aos fungos e as linhagens 46 e K2 foram eficientes na inibição do VSA. Um lixiviado micelial de um isolado de *L. edodes* também inibiu significativamente o crescimento de diversas bactérias fitopatogênicas como *P. syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie, *P. syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young *et al.*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Nakano) Dye, *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones (Pacumbaba *et al.*, 1999).

TABELA 1 – Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre a ocorrência de folhas murchas de tomateiro e peso da matéria fresca e seca

Tratamentos	Folhas murchas (%)		% de controle ³	Peso da Matéria	
	Dia 5	Dia 10		Fresca (g)	Seca (g)
T1 - Água ¹	0,00 a ²	0,00 c	-	1,90 a	0,29 a
T2 - Rs47 ¹ (inoculada)	3,33 a	100,00 a	-	0,25 b	0,10 b
T3 - ASM	5,44 a	46,32 b	53,68	0,91 b	0,13 b
T4 - Abl-29 10%	2,22 a	67,30 ab	32,70	0,65 b	0,14 b
T5 - Abl-29 20%	7,33 a	70,14 ab	29,86	0,59 b	0,13 b
T6 - Abl-26 10%	6,14 a	61,72 ab	38,28	0,70 b	0,15 b
T7 - Abl-26 20%	0,00 a	80,80 ab	19,20	0,88 b	0,19 b
T8 - Le-96/17 10%	1,54 a	44,00 b	66,00	2,06 a	0,29 a
T9 - Le-96/17 20%	1,55 a	71,75 ab	28,25	0,69 b	0,15 b
T10 - Le-96/22 10%	5,12 a	91,43 ab	8,57	0,64 b	0,15 b
T11 - Le-96/22 20%	1,77 a	82,03 ab	17,97	0,46 b	0,12 b

¹ Tratamentos controle.

² Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

³ Calculada com a avaliação do Dia 10, em relação à T2.

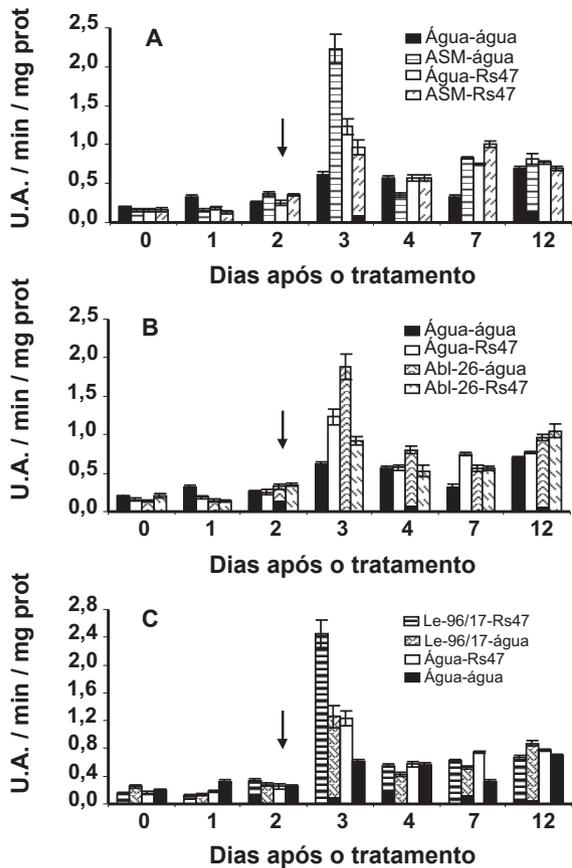


FIG. 1 – Atividade de peroxidase em resposta a aplicação de ASM (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes* Le-96/17 (C) nas folhas de tomateiro. A seta indica inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), no segundo dia após os tratamentos. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Em casa-de-vegetação, o isolado Le-96/17 10 % (v/v) de *L. edodes* e o ASM proporcionaram menor porcentagem de folhas murchas, aos 10 dias após a inoculação. Esse aumento em resistência observado nas plantas não ocorreu devido a uma ação direta dos indutores sobre o patógeno, uma vez que estes tratamentos não apresentaram atividade antibiótica *in vitro*, o qual é um dos critérios utilizados para se distinguir resistência induzida de outros mecanismos que possam reduzir a doença.

O efeito na redução da severidade da doença proporcionado por indutores também foi demonstrado por Soyly *et al.* (2003), onde plantas de tomate tratadas com ASM tiveram a severidade da doença causada por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* reduzida em 75 % aos 7 dias após a inoculação, mantendo o mesmo nível de controle até 14 dias após a inoculação. Quando este mesmo indutor foi utilizado visando o controle de *R. solanacearum* em três cultivares de tomateiro, ocorreu uma redução significativa no progresso da doença (Araújo *et al.*, 2005). Já Di Piero & Pascholati (2004a) observaram

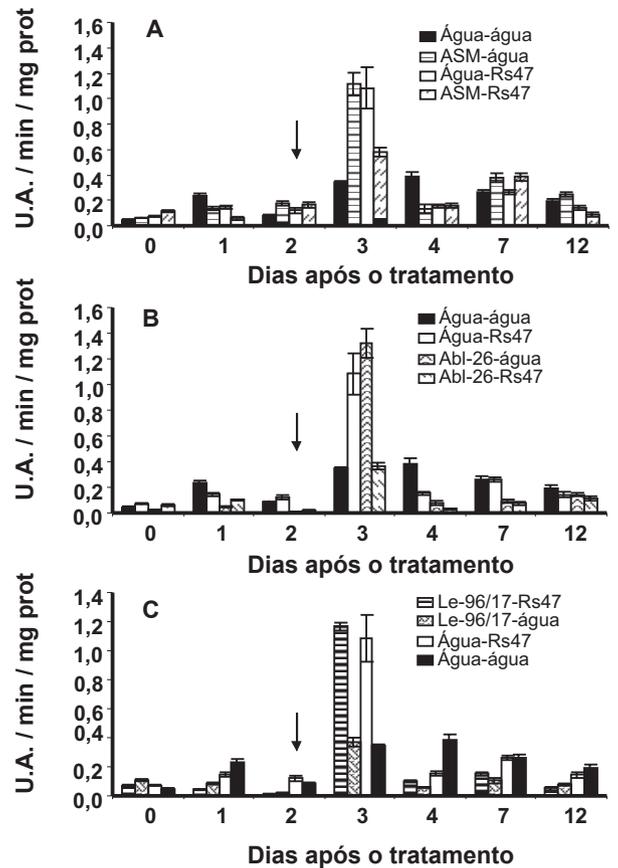


FIG. 2 – Atividade de quitinase em resposta a aplicação de ASM (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes* Le-96/17 (C) nas folhas de tomateiro. A seta indica inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), no segundo dia após os tratamentos. Barras representam a média \pm desvio padrão.

em plantas de tomate que o extrato aquoso do isolado Abl 99/28 de *A. blazei* reduziu significativamente a severidade de doença causada por *Xanthomonas vesicatoria* em casa-de-vegetação, com uma proteção média de 45 %.

Estudando o efeito de indução de resistência de extratos de cogumelos em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenaria* (Pass.) Ellis & Halst., Di Piero & Pascholati (2004b) verificaram que uma mistura de isolados de *L. edodes* reduziu significativamente a severidade da doença, tanto local como sistemicamente. Este efeito sistêmico da indução de resistência verificado neste trabalho também foi observado por Silva *et al.* (2003), o qual, ao aplicar em tomateiro o acibenzolar-S-metil (ASM) via pulverização foliar ou irrigado no solo contra *Xanthomonas vesicatoria*, não detectou diferença significativa entre os modos de aplicação do produto, sendo que as duas formas de aplicação proporcionaram proteção das plantas contra a mancha bacteriana, através da ativação dos mecanismos de defesa da planta.

Barretti (2005), em estudos para avaliar o efeito

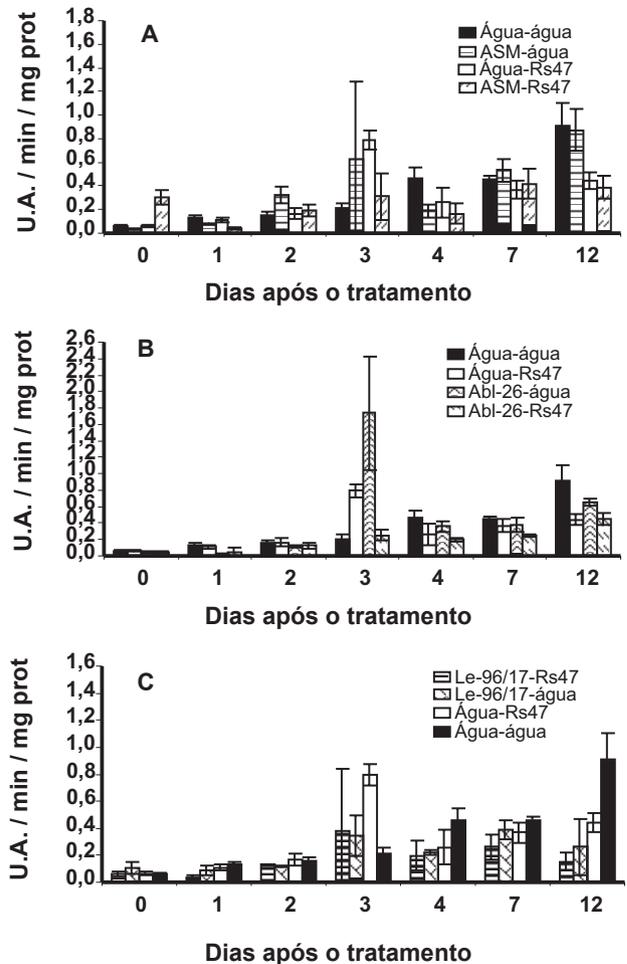
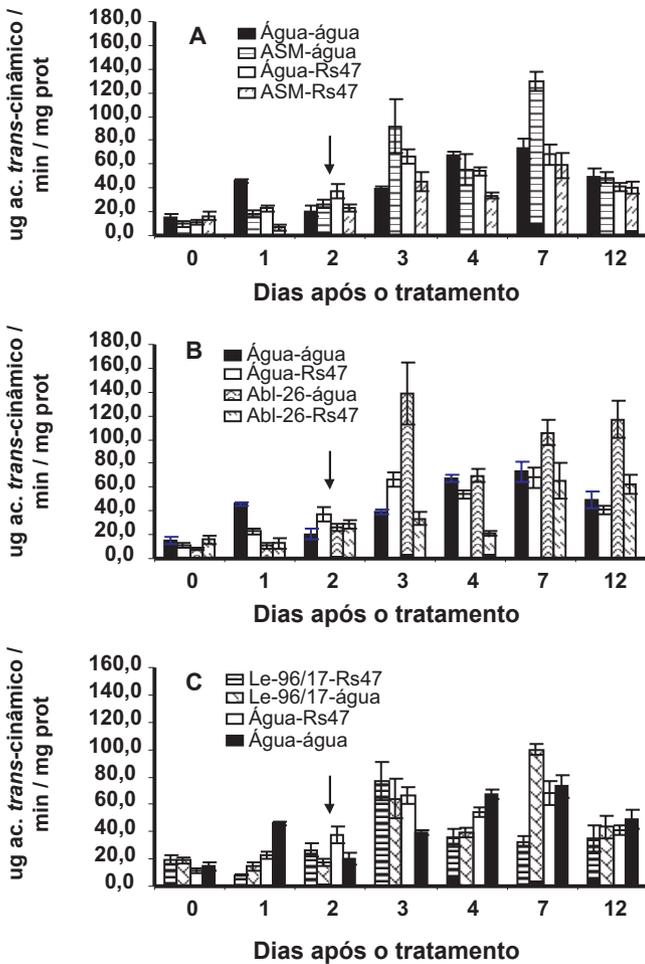


FIG. 3 – Atividade de fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação de ASM (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes* Le-96/17 (C) nas folhas de tomateiro. A seta indica inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), no segundo dia após os tratamentos. Barras representam a média \pm desvio padrão.

FIG. 4 – Atividade de polifenoloxidase em resposta a aplicação de ASM (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes* Le-96/17 (C) nas folhas de tomateiro. A seta indica inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), no segundo dia após os tratamentos. Barras representam a média \pm desvio padrão.

do ASM no controle de *R. solanacearum* em tomateiro, comprovou que não houve diferença no modo de aplicação do produto, seja por pulverização foliar seja irrigado no solo, mas houve redução significativa da severidade da doença em relação à testemunha não tratada. Os dois modos de aplicação do produto foram igualmente eficazes na proteção do tomateiro contra a murcha. No presente trabalho, os extratos dos cogumelos e o ASM foram aplicados no substrato, sendo também verificado a proteção das plantas de tomate contra a murcha bacteriana nos tratamentos onde foi aplicado o extrato aquoso Le-96/17 de *L. edodes* e o ASM.

Já as análises bioquímicas, realizadas a partir das folhas, mostraram que a atividade de peroxidase, para os tratamentos Le-96/17 e ASM, foi significativamente maior no 3° e 7° dias após o tratamento, respectivamente. Estes níveis de atividade de peroxidase obtidos nas folhas tratadas podem ter contribuído na redução de folhas murchas, uma

vez que estes dois tratamentos foram os melhores em relação aos demais. A participação de enzimas relacionadas à resistência foi evidenciada por Baysal *et al.* (2003), onde plantas de tomate tratadas com ASM e inoculadas com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* exibiram maior atividade de peroxidase aos 5 dias e de quitinase aos 2, 3, 5 e 7 dias após a inoculação com a bactéria. Esse aumento foi correlacionado com a resistência induzida nas plantas de tomate tratadas com ASM. Esta maior atividade de peroxidase e quitinase também foi observada no presente trabalho, aos 7 dias após o tratamento, ou seja, 5 dias após a inoculação, para as plantas tratadas com ASM e inoculadas com *R. solanacearum*.

Na avaliação da resistência à antracnose de quatro cultivares de feijão, pulverizadas com ácido salicílico ou com um fungo indutor, Campos *et al.* (2004) verificaram que, avaliando a atividade de peroxidase e polifenoloxidase

das plantas tratadas, cinco dias após a inoculação com o patógeno, houve um acréscimo na atividade destas enzimas nos tratamentos com ácido salicílico e com o fungo indutor em todas as cultivares. Em plantas de pepino tratadas com extrato aquoso de *L. edodes* e desafiadas com *Colletotrichum lagenaria*, Di Piero & Pascholati (2004b) constataram uma elevação na atividade local e sistêmica de peroxidases no 9º e 12º dias após o tratamento, respectivamente (no 3º e 6º dia após a inoculação do patógeno). Já para a atividade local e sistêmica de quitinases, não houve diferenças significativas entre quaisquer dos tratamentos após a inoculação com *C. lagenaria*.

A participação das peroxidases e oxidases de polifenóis na resistência induzida de tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* foi demonstrada por Cavalcanti *et al.* (2006), onde após a pulverização das plantas com ASM ou Ecolife®, foi evidenciado aumento na atividade destas enzimas logo nas primeiras horas após a pulverização, ocorrendo maior atividade no 5º dia após a inoculação do patógeno. No presente trabalho ocorreu aumento na atividade de peroxidase e quitinase, mas não ocorreu aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase nas plantas tratadas e inoculadas com a bactéria.

A atividade de peroxidase tem sido implicada em uma variedade de processos relacionados com a defesa das plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação e suberização. Nas plantas em geral, como por exemplo, em tomate, a peroxidase é uma das enzimas envolvidas no último passo na lignificação. O reforço da parede celular da planta por lignina e compostos fenólicos, aumenta a resistência da planta à degradação enzimática por patógenos e atua como barreira mecânica ao ingresso de toxinas, bem como a penetração física (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Para as enzimas fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e quitinase, ocorreu uma diminuição da atividade nas plantas tratadas com os indutores e inoculadas com a bactéria, exceto para o tratamento ASM para quitinase. Esta redução na atividade de algumas enzimas também foi verificada por Osswald *et al.* (2004), que estudando o patossistema sorgo – *Colletotrichum gramminicola* (Ces.) G.W. Wilson, observaram que apesar da indução na produção de fitoalexinas ser diretamente proporcional ao aumento da dose de ASM, ocorreu uma redução na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

Os extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* possuem substâncias antibióticas e/ou substâncias capazes de agir como elicitores de respostas de resistência em algumas plantas (local e sistemicamente), mostrando assim potencial para o uso no controle alternativo de patógenos de plantas (Eira *et al.*, 2005). A indução de resistência apresenta-se como componente de um manejo integrado, somando-se, por exemplo, ao emprego de cultivares com um nível de resistência satisfatório a *R. solanacearum*. Finalmente, a ausência de efeito *in vitro* do ASM e dos extratos de cogumelos sobre a bactéria, a alteração na atividade de

enzimas e a menor ocorrência de folhas murchas, em função dos tratamentos com ASM e Le-96/17, sugere que esses agentes atuam sobre as plantas de tomate através da indução de resistência.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Profa. Marli T.A. Minhoni pelo fornecimento dos basidiocarpos dos isolados de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Sakata Seeds Sudamerica Ltda pela disponibilização das sementes de tomate e do isolado bacteriano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, 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 23:5-8. 2005.
- ARAUJO, J.S.P., ROBBS, C.F. & RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte I. In: Luz, W.C., Fernandes, J.M.C., Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.) Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo RS. 2003. pp. 107-131.
- BARRETTI, P.B. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção contra a murcha bacteriana do tomateiro. Tese de Doutorado. Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 2005.
- BATISTA, M.F. & GUEDES, A.L.C. Problemas fitopatológicos da cultura do tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1981.
- BAYSAL, O., SOYLU, E.M. & SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747-753. 2003.
- BONALDO, S.M., PASCHOLATI, S.F. & ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. 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 SP. FEALQ. 2005. pp. 11-28.
- BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254. 1976.
- 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 39:637-643. 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., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende,

- M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. pp. 81-124.
- CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JUNIOR, P.M., COSTA, J.C.B. & SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31:372-380. 2006.
- CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J. & MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7:210-216. 2002.
- 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 purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de Doutorado. Piracicaba SP. ESALQ, Universidade de São Paulo. 2003.
- DI PIERO, R.M. & PASCHOLATI, S.F. Efeitos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. *Summa Phytopathologica* 30:57-62. 2004a.
- DI PIERO, R.M. & PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. *Summa Phytopathologica* 30:243-250. 2004b.
- DUANGMAL, K. & APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry* 64:351-359. 1999.
- 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* 7:281-299. 2005.
- 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* 8:629-643. 1996.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695. 1954.
- KIMURA, O. & CARMO, M.G.F. Enfermidades bacterianas do pimentão. *Informe Agropecuário* 18:66-70. 1995.
- KOMEMUSHI, S., YAMAMOTO, Y. & FUJITA, T. Antimicrobial substance produced by *Lentinula edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 23:81-86. 1995.
- KOMEMUSHI, S., YAMAMOTO, Y. & FUJITA, T. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinula edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 24:21-25. 1996.
- LOPES, C.A. Doenças bacterianas da batata. *Informe Agropecuário* 7:40-42. 1981.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1997.
- LOPES, C.A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. *Informe Agropecuário* 20:56-60. 1999.
- LUSO, M.F.G. & PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica* 25:244-249. 1999.
- NICHOLSON, R.L. & HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389. 1992.
- 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 sublineolum*. *Summa Phytopathologica* 30:415-420. 2004.
- PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A. & PACUMBABA JUNIOR, 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* 83:20-23. 1999.
- ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa MG. UFV. 1995.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H. & HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819. 1996.
- SASAKI, S.H., LINHARES, R.E.C., NOZAWA, C.M., MONTALVÁN, R. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:52-55. 2001.
- SILVA, L.H.C.P., RESENDE, M.L.V., SOUZA, R.M., CAMPOS, J.R., & CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. *Summa Phytopathologica* 29:177-181. 2003.
- 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* 165:1069-1075. 2003.
- STANGARLIN, J.R. & PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica* 20:16-21. 1994.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* 34:68-71. 2006.
- WAKIMOTO, S., UTATSU, K., MATSUO, N. & HAYASHI, N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 48:620-627. 1982.
- WIRTH, S.J. & WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods* 12:197-205. 1990.

Recebido 8 Fevereiro 2007 - Aceito 28 junho 2007- FB 7012