

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Ricardo Ferrari Silva

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Área de concentração
Fitopatologia

Piracicaba

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Ferrari Silva
Engenheiro Agrônomo

Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* **subsp. *michiganensis*)**

Orientador:

Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Área de concentração
Fitopatologia

Piracicaba

2007

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

Silva, Ricardo Ferrari

Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) / Ricardo Ferrari Silva. - - Piracicaba, 2007.

109 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Berinjela 3. Cancro (Doença de plantas - Resistência) 4. Cogumelos comestíveis 5. Cromatografia 6. Murcha (Doença de planta - Resistência) 7. Tomate I. Título

CDD 635.646

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

“Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia Nele, e o mais Ele fará.”

Salmo 37:5

“Com efeito, grandes coisas fez o
Senhor por nós; por isso estamos
alegres.”

Salmo 126:3

A minha esposa, Scheila,
Aos meus pais, Nivaldo e Marli,
E aos meus irmãos e suas famílias, Raquel e
Flávio, Daniel, Angélica e Davi, por seu amor, apoio
e confiança na realização deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela oportunidade oferecida, pela confiança, amizade, orientação e pelo convívio agradável durante estes quatro anos.

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati, pelo apoio, amizade, orientação e valiosas contribuições ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda., pelo fornecimento das sementes e dos isolados bacterianos.

Ao pesquisador Dr. Carlos Lopes, da EMBRAPA-CNPq, por sua atenção, pelas informações úteis compartilhadas e pelo envio dos isolados bacterianos.

A Prof. Dra. Marli T. A. Minhoni (UNESP, Botucatu), pelo fornecimento dos cogumelos utilizados nesta tese.

Aos demais professores do Setor de Fitopatologia, pelos ensinamentos e pelos momentos agradáveis proporcionados.

Aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Ana Paula, Alan, Daniela, Eliane, Isolda, Luciano, Luiz Fernando, Raquel e Samuel, pelo bom convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, André, Camila, Danilo, Dirceu, Ely, Leonardo, Maria Cristina, Marisa, Marizete, Maurício, Nívea, Odair, Patrícia e Robson, pela amizade, incentivo e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários Fernanda e Rodolfo, Heloísa, Sílvia, Edivaldo, Carmen e Sandra, Pedro Arthuso, Jéferson e Linda, pela amizade e atenção dispensadas.

Aos amigos Adriana, Carol, Daniel, Débora, Estela e Silvio pelos bons momentos passados juntos.

Aos demais amigos do Setor de Fitopatologia, pelo agradável convívio e amizade.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências	14
2 AÇÃO INDUTORA DE RESISTÊNCIA DE <i>Lentinula edodes</i> E <i>Agaricus blazei</i> EM PLANTAS DE BERINJELA CONTRA <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
Resumo	19
Abstract.....	20
2.1 Introdução.....	20
2.2 Desenvolvimento.....	22
2.2.1 Revisão Bibliográfica	22
2.2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.2.1 Obtenção dos isolados de <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i>	24
2.2.2.2 Obtenção dos extratos aquosos de <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i>	25
2.2.2.3 Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas.....	25
2.2.2.4 Obtenção do inóculo bacteriano	25
2.2.2.5 Efeito <i>in vitro</i> dos cogumelos sobre <i>R. solanacearum</i>	26
2.2.2.6 Proteção de plantas em casa-de-vegetação.....	26
2.2.2.7 Obtenção dos extratos proteicos.....	27
2.2.2.8 Dosagem de proteínas totais	28
2.2.2.9 Atividade de peroxidase	28
2.2.2.10 Atividade de quitinase	29
2.2.2.11 Atividade de polifenoloxidase.....	29
2.2.2.12 Atividade de fenilalanina amônia-liase	29
2.2.2.13 Separação através de precipitação dos componentes das preparações com atividade biológica	30
2.2.2.14 Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio.....	30
2.2.2.15 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica.....	31
2.2.2.16 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia	31

2.2.2.17	Análise eletroforética das frações biologicamente ativas.....	32
2.2.3	Resultados.....	33
2.2.3.1	Efeito <i>in vitro</i> dos cogumelos sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	33
2.2.3.2	Proteção de plantas em casa-de-vegetação.....	34
2.2.3.3	Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática.....	36
2.2.3.4	Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio.....	41
2.2.3.5	Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica.....	42
2.2.3.6	Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia	43
2.2.3.7	Análise eletroforética das frações biologicamente ativas.....	45
2.2.4	Discussão	46
2.3	Considerações Finais	49
	Referências	49
3	AÇÃO INDUTORA DE RESISTÊNCIA DE <i>Lentinula edodes</i> E <i>Agaricus blazei</i> EM TOMATEIRO CONTRA <i>Ralstonia solanacearum</i> E <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	56
	Resumo	56
	Abstract.....	57
3.1	Introdução.....	58
3.2	Desenvolvimento	60
3.2.1	Revisão Bibliográfica	60
3.2.2	Material e Métodos.....	64
3.2.2.1	Obtenção dos isolados de <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i>	64
3.2.2.2	Obtenção dos extratos aquosos de <i>L. edodes</i> e de <i>A. blazei</i>	64
3.2.2.3	Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas.....	64
3.2.2.4	Obtenção do inóculo bacteriano	65
3.2.2.5	Efeito <i>in vitro</i> dos cogumelos sobre <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e <i>R. solanacearum</i>	65
3.2.2.6	Proteção de plantas em casa-de-vegetação.....	66
3.2.2.7	Obtenção dos extratos proteicos.....	67
3.2.2.8	Dosagem de proteínas totais	68
3.2.2.9	Atividade de peroxidase	69

3.2.2.10 Atividade de quitinase	69
3.2.2.11 Atividade de polifenoloxidase	69
3.2.2.12 Atividade de fenilalanina amônia-liase	70
3.2.2.13 Separação através de precipitação dos componentes das preparações com atividade biológica	70
3.2.2.14 Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio	70
3.2.2.15 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica.....	71
3.2.2.16 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia	72
3.2.2.17 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas.....	72
3.2.3 Resultados.....	73
3.2.3.1 Efeito <i>in vitro</i> de <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i> sobre <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e <i>R. solanacearum</i>	73
3.2.3.2 Proteção de plantas em casa-de-vegetação.....	75
3.2.3.3 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática.....	78
3.2.3.4 Bioensaio dos componentes da precipitação com sulfato de amônio.....	87
3.2.3.5 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica.....	88
3.2.3.6 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia	89
3.2.3.7 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas.....	92
3.2.4 Discussão	93
3.3 Considerações Finais	100
Referências	101

RESUMO

Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Devido ao aumento da preocupação com o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente e na saúde humana, busca-se uma agricultura sustentável. É no âmbito dessa questão que a resistência induzida torna-se uma ferramenta fundamental no manejo integrado de doenças e indispensável para uma nova agricultura, mais racional e sustentável. Dentre os diversos agentes bióticos e abióticos, utilizados em trabalhos de indução de resistência de plantas a patógenos, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* vem sendo pesquisados. Desse modo, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes isolados de *L. edodes* e *A. blazei* e do acibenzolar-S-metil (aSm) *in vitro* contra as bactérias e o controle de doenças de importância econômica para as culturas do tomate e da berinjela, em casa-de-vegetação. Depois de obtida a proteção, estudar os possíveis mecanismos bioquímicos ativados nas plantas através do uso dos extratos dos cogumelos e buscar a purificação parcial destes extratos, a fim de identificar o(s) princípio(s) ativo(s). No patossistema berinjela/*Ralstonia*, os extratos aquosos dos cogumelos não exerceram nenhum efeito direto sobre o patógeno, sendo que os isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei* reduziram significativamente a ocorrência de folhas murchas das plantas em casa-de-vegetação, em relação aos demais tratamentos. Ocorreu um aumento na atividade da peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase nas folhas tratadas. O precipitado 60-80% obtido pela precipitação com sulfato de amônia e a fração 4 da cromatografia de troca aniônica (CTA) de Abl-28 reduziram a ocorrência de folhas murchas, sendo que a separação eletroforética revelou a presença de uma banda no gel com aproximadamente 29 kDa nesta fração. Em tomate, os extratos aquosos dos isolados dos cogumelos e o acibenzolar-S-metil não exerceram nenhum efeito inibitório *in vitro* no crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Porém, os isolados Abl-26 de *A. blazei*, Le-96/17 de *L. edodes* e aSm foram os que conferiram maior proteção das plantas de tomates contra os patógenos, diminuindo a ocorrência de folhas murchas, proporcionando um aumento na atividade da peroxidase no patossistema tomate/*Ralstonia* e um aumento na atividade de peroxidase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase no patossistema tomate/*Clavibacter*. O precipitado 40-80% de Le-96/17 foi submetido à CTA, obtendo-se seis frações protéicas. As frações 3 e 4, junto com aSm e o extrato aquoso de Le-96/17 reduziram a ocorrência de folhas murchas. A separação eletroforética destas frações da CTA, do precipitado 40-80% e do extrato aquoso de Le-96/17 revelaram a presença de mais de uma banda no gel na fração 3 e 4 da CTA, no precipitado 40-80% e no extrato aquoso bruto de Le-96/17. Com base nos resultados, os cogumelos *A. blazei* e *L. edodes* apresentam compostos que induziram resistência em plantas berinjela e tomate, podendo auxiliar no controle de doenças.

Palavras-chave: Indução de resistência; *Lentinula edodes*; *Agaricus blazei*; Murcha bacteriana; Cancro bacteriano; Tomate; Berinjela

ABSTRACT

Induced resistance by *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* in tomato plant and eggplant against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Because the increase of the impact of chemical products in the environment and in human health, a search by sustainable agriculture is needed. It is in the scope of this problem that the induced resistance becomes a tool in the integrated management of pests and diseases and indispensable for a new agriculture, more rational and sustainable. Among the biotic and abiotic agents used to induce resistance, the mushrooms *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* have been studied. Thus, the objectives of the present work were to evaluate the effects of different isolates of *L. edodes* and *A. blazei* and of the acibenzolar-S-methyl (aSm) on *in vitro* bacterial growth and the control of the diseases in tomato and eggplant under greenhouse conditions. The studies also tried to elucidate the mode of action of the extracts from the fruiting bodies and partially purify them. In eggplant plants, the aqueous extracts from the different mushroom isolates did not have any direct effect on the pathogen. The isolates Abl-11 and Abl-28 of *A. blazei* reduced the wilt in eggplant leaves, under greenhouse conditions, and increased peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities in treated leaves. The fraction of aqueous extract of *A. blazei* (Abl-28) obtained with ammonium sulphate and fraction 4 from anion exchange chromatography reduced bacterial wilt and a protein fraction exhibiting molecular mass around 29 kDa was obtained. In tomato plants, the aqueous extracts from the different mushrooms and the acibenzolar-S-methyl did not inhibit *in vitro* growth of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. However, the isolates Abl-26 of *A. blazei*, Le-96/17 of *L. edodes* and aSm protected tomato plants against the bacterial pathogens, reducing the wilt and causing an increase in peroxidase activity in the tomato/*Ralstonia* interaction and an increase in peroxidase, chitinase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities in the tomato/*Clavibacter* interaction. The ammonium sulphate fraction of Le-96/17 was submitted to anion exchange chromatography, and the proteins from fractions 3 and 4, aSm and the aqueous extract of Le-96/17 reduced the occurrence of wilt in the leaves. A protein fraction exhibiting proteins with molecular mass around 29, 37 and 45 kDa was obtained in fractions 3 and 4. Thus, the results showed that the mushrooms *A. blazei* and *L. edodes* have substances that induce resistance in eggplant and tomato plants.

Keywords: Induction of resistance; *Lentinula edodes*; *Agaricus blazei*; Bacterial wilt; Bacterial canker; Tomato; Eggplant

1 INTRODUÇÃO

A redução da produção em uma lavoura pode ser ocasionada por diversos fatores, dentro os quais os principais seriam as doenças, sejam elas causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematóides. Dentre estes patógenos que ocorrem sobre as espécies de plantas de expressão econômica na agricultura brasileira, as bactérias vêm assumindo importância crescente, causando elevadas perdas, embora não existam estatísticas precisas. (ARAÚJO; ROBBS; RIBEIRO, 2003; KIMURA; CARMO, 1995; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; ROMEIRO, 1995). Estes fitopatógenos podem causar danos tanto na parte aérea como no sistema radicular, podendo levar a perda total da cultura. Como nem sempre é possível utilizar a resistência genética, o uso de agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais frequente (GHINI; KIMATI, 2000; MOTOYAMA et al., 2003).

Dentre as diversas bactérias que causam grandes prejuízos, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith tem promovido elevadas perdas em várias culturas a nível nacional. Em tomate, tem sido assinalada desde o Estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul (BATISTA; GUEDES, 1981). Outra bactéria, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis, agente causal do cancro bacteriano em pimentão e tomate, é uma das doenças mais importantes para tomateiro estaqueado, podendo destruir grande parte da plantação. A doença tem causado em todo o mundo consideráveis perdas, e o patógeno pode sobreviver em sementes, no solo e em hospedeiros secundários (AGRIOS, 2005; DIAS; TAKATSU, 1989; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Uma vez que não existe produto químico que controle eficientemente estas doenças, e o seu uso indiscriminado tem aumentado às preocupações com o meio ambiente e com a saúde humana, o uso de métodos alternativos de controle, entre os quais se incluem o controle biológico e a indução de resistência em plantas, estão sendo pesquisados e utilizados.

As plantas possuem tanto mecanismos pré-formados quanto induzíveis para resistir à invasão dos patógenos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A indução de resistência em plantas pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas e/ou químicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora. É um fenômeno sistêmico ou local, efetivo contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos ou vírus (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Os agentes ativadores ou indutores são

representados por microrganismos saprofíticos, patógenos de plantas, metabólitos microbianos, extratos de plantas sadias ou imunizadas, agentes químicos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005; DUKE; RAMIREZ; TOMIYAMA, 1987; JENSEN et al., 1998).

Estes indutores aumentam o nível de resistência da planta, sem alterar seu genoma. Eles ocorrem de maneira não específica, por meio da ativação de genes que codificam diversas respostas de defesa, que incluem enzimas como peroxidase e polifenoloxidase, que catalisam a formação de lignina e oxidação de compostos fenólicos (que são tóxicos aos patógenos); proteínas relacionadas à patogênese, como por exemplo, quitinases e β -1,3-glucanases, que podem agir diretamente sobre o patógeno degradando sua parede e causando a lise celular, ou indiretamente, através de sinais bioquímicos gerados pela degradação da parede celular dos patógenos; fenilalanina amônia-liase, enzima envolvida na via dos fenilpropanóides e associada com a biossíntese de fitoalexinas, fenóis, ligninas e ácido salicílico (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; MILOSEVIC; SLUSARENKO, 1996; RAMAMOORTHY; RAGUCHANDER; SAMIYAPPAN, 2002; TUZUN, 2001).

A resistência induzida depende, entre outros fatores, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com o indutor e a inoculação com o patógeno (agente desafiante). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, os quais envolvem a síntese ou o acúmulo de compostos, são importantes para o fenômeno da resistência induzida (RYALS et al., 1996). Por exemplo, o tratamento com o aminoácido não-proteico DL- β -amino-*n*-butírico (BABA) só foi eficiente em proteger plantas de girassol contra *Plasmopara helianthi* quando aplicado via solo, um dia antes da inoculação com o patógeno (TOSI; LUIGETTI; ZAZZERINI, 1998). Frey e Carver (1998) só obtiveram indução de resistência sistêmica em ervilha quando as folhas tratadas foram inoculadas três ou mais dias após a aplicação de ácido salicílico.

Além do intervalo de tempo, a concentração do indutor também pode afetar a ativação da resistência da planta. Tosi, Luigetti e Zazzerini (1998) obtiveram 38, 39 e 83% de proteção em girassol contra *P. helianthi* utilizando BABA colocado no solo a 50, 100 e 250 mg/ml, respectivamente.

Dentre os indutores abióticos de resistência, o ácido salicílico (AS) e seus análogos são os mais importantes. Ele representa o primeiro composto derivado de plantas demonstrado como indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR). Posteriormente, o ácido 2,6 dicloroisonicotínico

(INA), um análogo funcional do AS, foi o primeiro composto sintético a ativar a SAR. Porém, devido ao fato do AS e do INA serem fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas, eles não apresentam potencial para uso comercial como protetores. Mais recentemente, outro análogo funcional do AS, o acibenzolar-S-metil (aSm), um composto do grupo benzotiadiazole, revelou-se um potente ativador de SAR, conferindo proteção em condições de campo contra um amplo espectro de patógenos de diversas espécies de plantas cultivadas (GORLACH *et al.*, 1996).

Vários estudos têm apontado o aSm como um dos mais promissores indutores de resistência vegetal. Sua molécula é um éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbótico (SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005), sendo empregado e estudado como indutor de resistência em várias espécies vegetais, como em tomate contra *Cucumber mosaic virus* (ANFOKA, 2000) e contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SOYLU; BAYSAL; SOYLU, 2003), em melão contra *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* (BUZI *et al.*, 2004), em batata contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (BENELLI; DENARDIN; FORCELINI, 2004), em pós-colheita de pêssigo contra *Penicillium expansum* (LIU *et al.*, 2005), em pimentão contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (ROMEIRO; KOUSIK; RITCHIE, 2001), entre outras.

Já entre os diversos indutores bióticos, os cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol) apresentam substâncias no corpo de frutificação (basidiocarpo) e no micélio com atividades antibióticas e imuno-regulatórias (PASCHOLATI; STANGARLIN; PICCININ, 1998), as quais têm sido relatadas como atuantes no controle de doenças no homem. Trabalhos realizados na área agrônômica também têm mostrado o potencial destes fungos para o controle de doenças de plantas.

Os cogumelos comestíveis apresentam compostos que tem propriedades funcionais, em particular os homo e hetero-glucanos com ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-3)$ e $\beta(1-6)$, supostamente responsáveis por algumas das propriedades benéficas dos cogumelos (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000). Como medicamentos, as β -glucanas são utilizadas no Japão desde a década de 80, no tratamento de pacientes com câncer e comercializados com nomes comerciais como Krestin[®] (*Trametes versicolor*), Lentinan[®] (*L. edodes*) e Sonifilan[®] (*S. commune*) (MIZUNO, 1999 apud CAMELINI *et al.*, 2005).

Além das propriedades farmacológicas, os polissacarídeos de origem fúngica, como os encontrados em *A. blazei*, apresentam várias outras propriedades como ações anti-mutagênicas,

bactericidas e estimulantes das atividades imunológicas do organismo humano (TEIXEIRA, 1999). De acordo com Kawagishi et al. (1989), a fração de polissacarídeo extraído de *A. blazei* que apresenta atividade antitumoral é composta de um complexo de β -(1-6)-D-glucano e proteínas. Lentinam é um composto ativador do sistema imunológico encontrado em *L. edodes*, sendo uma β -1,3-D-glucana com alto peso molecular com atividade antitumoral, isolada a partir do extrato aquoso do corpo de frutificação do fungo (BREENE, 1990).

No caso dos fitopatógenos, Komemushi, Yamamoto e Fujita (1996) isolaram do cogumelo shiitake algumas substâncias com efeito antimicrobiano, entre as quais β -fenetil álcool e octa-2,3-dieno-5,7 dieno-1-ol (lentinamicina) e demonstraram que as mesmas são efetivas no controle de bactérias Gram negativas. Tendo em vista que a maioria das bactérias fitopatogênicas é do tipo Gram negativa, existe um indicativo do potencial de uso de *L. edodes* para o controle de bactérias fitopatogênicas. Um dos exemplos é o trabalho de Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Junior (1999), os quais demonstraram que o lixiviado micelial de *L. edodes* inibiu significativamente o crescimento de todas as espécies de bactérias fitopatogênicas testadas, incluindo *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A ação inibitória também foi evidenciada sobre o crescimento de bactérias que afetam alimentos e animais como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Piccinin (2000) demonstrou que filtrados de estipe e do micélio de *L. edodes* protegeram plantas de maracujá contra *Xanthomonas passiflorae* e que o filtrado de basidiocarpo protegeu plantas de sorgo contra *Colletotrichum sublineolum*. No patossistema pepino – *Colletotrichum lagenarium*, Di Piero e Pascholati (2004b) demonstraram que os cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* reduziram a severidade de *C. lagenarium* em plantas de pepino, local e sistemicamente, sendo o efeito protetor dependente da concentração do extrato de cogumelo e, em menor grau, do intervalo de tempo indução-inoculação e do ambiente. Além disso, o extrato de *L. edodes* promoveu aumento nas atividades de quitinase e peroxidase nas plantas tratadas.

Visando avaliar os efeitos dos cogumelos no controle da mancha bacteriana do tomateiro, Di Piero e Pascholati (2004a) verificaram que os isolados de *L. edodes*, de maneira geral, não controlaram a bacteriose. Por outro lado, o isolado ABL 99/28 de *A. blazei* reduziu

significativamente a severidade da doença, além de promover um aumento da atividade de β -1,3-glucanase nas plantas de tomate tratadas. Este efeito sugeriu que ABL 99/28 induziu resistência em tomateiro contra *X. vesicatoria*.

Assim, a indução de resistência em plantas mostra-se como um dos métodos de controle de doenças infecciosas com grande potencial de uso (CAVALCANTI et al., 2005). No entanto, é importante aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de ação do agente indutor de resistência, de acordo com as considerações de Ryals et al. (1996) e de Pascholati (1997).

Em razão do efeito positivo de extratos de *L. edodes* e *A. blazei*, e do indutor abiótico acibenzolar-S-metil, na indução de resistência a doenças em plantas e da necessidade de se conhecer os mecanismos envolvidos na ação do agente indutor, o presente trabalho de pesquisa teve por objetivos:

- Avaliar a ação indutora de resistência de extratos destes basidiomicetos e do acibenzolar-S-metil em plantas de tomate e berinjela contra bactérias causadoras de murcha e cancro;
- Determinar alterações bioquímicas nas plantas tratadas, visando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ação envolvidos na indução de resistência;
- Identificar o(s) princípio(s) ativo(s) existente(s) nos extratos que podem promover o efeito indutor.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952 p.

ANFOKA, G.H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 6, p. 401-405, 2000.

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. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2003. v. 11, p. 107-131.

BATISTA, M.F.; GUEDES, A.L.C. **Problemas fitopatológicos da cultura do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1981. 4 p. (CNPq. Comunicado Técnico, 21).

BENELLI, A.I. H.; DENARDIN, N.D.; FORCELINI, C.A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra Canela Preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 263-267, 2004.

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. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 11-28.

BREENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of Resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 1, p. 34-42, 2004.

CAMELINI, C.M.; MENDONÇA, M.; DIAS, P.F.; MARASCBIN, M. β -glucanas do cogumelo *Agaricus subrufescens*. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 35, p. 36-47, 2005.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito 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, 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 *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 2, p. 243-250, 2004b.

DIAS, S.C.; TAKATSU, A. Fístula bacteriana do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 10, 1989.

DUKE, N.; RAMIREZ, A.V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 119, p. 232-239, 1987.

FREY, S.; CARVER, T.L.W. Induction of systemic resistance in pea to pea powdery mildew by exogenous application of salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 239-245, 1998.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. 78 p.

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.

JENSEN, B.D.; LATUNDE-DADA, A.O.; HUDSON, D.; LUCAS, J.A. Protection of brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. **Pesticide Science**, London, v. 52, p. 63-69, 1998.

KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; YUMEN, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Isolation and properties of a lectin from fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-278, 1989.

KIMURA, O.; CARMO, M.G.F. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 66-70, 1995.

KOMEMUSHI, S.; YAMAMOTO, Y.; FUJITA, T. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinula edodes*. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 21-25, 1996.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: CERES, 2005. v. 2, p. 607-626.

LIU, H.; JIANG, W.; BI, Y.; LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Netherlands, v. 35, n. 3, p. 263–269, 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1997. 70 p.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. β -glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, Barking, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MILOSEVIC, N.; SLUSARENKO, A.J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 143–157, 1996.

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.

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**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 20-23, 1999.

PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 81-82, 1997.

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E. **Cogumelos: cultivo e comercialização (shitake e cogumelo do sol)**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. 85 p. (Coleção Agroindústria; v. 17).

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, 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 1, p. 55–68, 2002.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa: UFV. 1995. 283 p.

ROMEIRO, A.M.; KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2001.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H-Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTO, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 3, p. 51-80.

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, n. 5, p. 1069-1075, 2003.

TEIXEIRA, E.M. **Cogumelo do sol: *Agaricus blazei***. Jaboticabal: FUNEP, 1999. 38 p.

TOSI, L.; LUIGETTI, R.; ZAZZERINI, A. Induced resistance against *Plasmopara helianthi* in sunflower plants by DL-β-Amino-n-butyric acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, n. 5, p. 295-299, 1998.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 85-93, 2001.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

2 AÇÃO INDUTORA DE RESISTÊNCIA DE *Lentinula edodes* E *Agaricus blazei* EM PLANTAS DE BERINJELA CONTRA *Ralstonia solanacearum*.

Resumo

Os cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* vem sendo utilizados em pesquisas que visam o controle tanto de doenças em humanos como em vegetais. Seus extratos aquosos dos basidiocarpos possuem substâncias do tipo antibiótico e outras substâncias capazes de atuarem como elicitoras da resposta de resistência em plantas, mostrando-se assim promissores no controle alternativo de fitopatógenos. Com o objetivo de estudar o efeito destes extratos aquosos e do indutor acibenzolar-S-metil (aSm) no controle da murcha bacteriana em berinjela, observar o modo de ação destes materiais na atividade protetora, através de alterações na atividade de determinadas enzimas, e de obter moléculas de interesse agrônômico é que o presente trabalho foi realizado. Inicialmente, verificou-se que os isolados de *A. blazei* e *L. edodes*, utilizados em diversas diluições, não exerceram nenhum efeito inibitório *in vitro* no crescimento de *Ralstonia solanacearum*. Porém, os isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei* reduziram significativamente a ocorrência de folhas murchas das plantas de berinjela, em casa-de-vegetação, quando aplicados a 15% (v/v), dois dias antes da inoculação das plantas com o patógeno. O aSm também reduziu a ocorrência de folhas murchas das plantas de berinjela. No estudo de possíveis alterações na atividade enzimática, ocorreu um aumento na atividade da peroxidase em folhas de berinjela aos 7 e 12 dias após o tratamento com Abl-28. Para o aSm e Abl-11, o aumento na atividade de peroxidase ocorreu apenas aos 7 e aos 12 dias após o tratamento, respectivamente. A atividade de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foi alterada nas plantas tratadas com Abl-28 ou com aSm. Plantas de berinjela tratadas com Abl-11 exibiram uma aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase aos 7 e 12 dias após o tratamento e de polifenoloxidase aos 7 dias após o tratamento, enquanto que a atividade de quitinase não foi alterada. Como o isolado Abl-28 apresentou os melhores resultados na redução da murcha e atividade de peroxidase, seu extrato aquoso bruto foi fracionado com sulfato de amônio. A fração precipitada a 60-80% de saturação mostrou-se mais efetiva em reduzir a murcha bacteriana, sendo então submetida à cromatografia de troca aniônica (CTA). Após a CTA, cinco frações protéicas foram obtidas e a fração 4 reduziu a murcha bacteriana em berinjela. A separação eletroforética destas frações da CTA e do precipitado 60-80% revelou a presença de uma banda no gel na fração 4 da CTA e no precipitado 60-80%, com aproximadamente 29 kDa. Com base nos resultados, o isolado Abl-28 de *A. blazei* induziu resistência em berinjela contra *R. solanacearum* e obteve-se uma purificação parcial do elicitor presente no basidiocarpo do mesmo.

Palavras-chave: Proteínas-RP; Resistência induzida; Murcha bacteriana; Berinjela; Cromatografia de troca aniônica

Abstract

The mushrooms *Agaricus blazei* and *Lentinula edodes* can control human and vegetable diseases. The aqueous extracts of the mushrooms have substances with antibiotic activity and others able to activate the defense mechanisms in plants against pathogens, exhibiting potential in the alternative control of diseases. The objectives of the present work were to study the effects of aqueous from the mushrooms extracts and acibenzolar-S-metil (aSm) in the control of bacterial wilt in eggplants, the mode of action of these mushrooms materials in the protective activity, based upon the activity of some enzymes and partially purify the active compounds. Initially, it was shown that the isolates of *A. blazei* and *L. edodes*, used in different concentrations, did not inhibit *in vitro* bacterial growth. However, the isolates Abl-11 and Abl-28 of *A. blazei* reduced the wilt in eggplant leaves under greenhouse conditions, when the mushroom extract at 15% (v/v) was applied 2 days before plant inoculation. The aSm also reduced the wilt in eggplant leaves. Regarding enzyme activity, plants treated with the extract from Abl-28 exhibited increased peroxidase activity 7 and 12 days after the treatment. For aSm and Abl-11, the increase in peroxidase activity occurred only 7 and 12 days after the treatment, respectively. The chitinase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities did not change in plants treated with Abl-28 or aSm. Plants of eggplant treated with Abl-11 exhibited increased phenylalanine ammonia-lyase activity 7 and 12 days after the treatment and polyphenoloxidase activity 7 days after the treatment, whereas the chitinase activity did not change. Since the isolate Abl-28 was the best one in reducing of bacterial wilt and increasing peroxidase activity, its aqueous extract was fractionated with ammonium sulphate. The fraction from precipitation 60-80% was the most effective one in reducing bacterial wilt. Then, this fraction was submitted to anion exchange chromatography (AEC). The fraction 4 from AEC reduced bacterial wilt and a protein fraction exhibiting molecular mass around 29 kDa was obtained. Thus, with these results, it is suggested that the isolate Abl-28 of *A. blazei* induced resistance in eggplants against *R. solanacearum* and a partial purification of the elicitor present in the *A. blazei* fruiting body was obtained.

Keywords: PR-protein; Induced resistance; Bacterial wilt; Eggplant; Anion exchange chromatography

2.1 Introdução

A berinjela (*Solanum melongena* L.) é uma solanácea originária de regiões tropicais do Oriente, sendo cultivada pelos chineses e árabes há muitos séculos. Foi introduzida na Europa pelos árabes durante a Idade Média (FILGUEIRA, 2000). No Brasil é uma hortaliça bastante valorizada, sendo comercializada o ano inteiro no CEAGESP – SP, em um volume aproximado de 22.315 toneladas, em 2004 e 20,7 toneladas exportadas em 2003 (FNP, 2006). O consumo vem crescendo, motivado pela procura por parte dos consumidores por produtos mais saudáveis e com propriedades medicinais, com destaque para suas propriedades redutoras do nível de colesterol (FILGUEIRA, 2000).

Entre as diversas doenças que atacam as solanáceas, destaca-se a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith), a qual 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 (HAYWARD, 1991; LOPES, 1994). É considerada a mais importante das doenças que atacam a berinjela, podendo causar perdas de 10 a 100% (LI; GOTH; BARKSDALE, 1988).

A primeira descrição da espécie *Ralstonia solanacearum* (anteriormente referida como *Pseudomonas solanacearum*) foi efetuada por Smith em 1896 (PALLERONI, 1984). No Brasil, a espécie foi relatada pela primeira vez em 1922, em fumo e batata (VON PARSEVAL, 1922), embora a natureza da doença só tenha sido confirmada posteriormente (KRAMER; AMARAL, 1944). É uma bactéria cosmopolita e a dificuldade em se desenvolver estratégias de controle da murcha tem sido atribuída, em grande parte, à falta de conhecimentos básicos sobre a ecologia e a evolução deste fitopatógeno (LOPES, 1994; COOK; SEQUEIRA, 1994).

A existência de três raças e de três (I, II, III) das cinco biovars de *R. solanacearum* no Brasil, aliada ao vasto círculo de plantas hospedeiras, resulta em aspectos epidemiológicos complexos. Levantamentos conduzidos em diversas regiões brasileiras, com ênfase em solanáceas, indicaram a presença da biovar I em todas elas, da biovar II predominantemente em climas amenos (Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e da biovar III no Norte e Nordeste. Considerando o círculo de hospedeiras da bactéria, a raça 1 ocorre em um maior número de solanáceas cultivadas (tomateiro, batata, berinjela, jiló e fumo), incluindo as biovars I, III e IV. A raça 2 ataca bananeira e helicônias, enquanto a raça 3 (biovar II) é considerada específica de batata, ocorrendo em regiões mais frias, embora possa infectar naturalmente algumas outras solanáceas (ARAÚJO; ROBBS; RIBEIRO, 2004).

O aparecimento da murcha se manifesta inicialmente nas folhas superiores, dentro de poucos dias, em condições favoráveis à doença (AKIEW; TREVORROW, 1994). As seções do caule de plantas infectadas apresentam fluxo bacteriano caracterizado por exsudação de pus (FERREIRA; SALGADO, 1995; AGRIOS, 2005). As plantas infectadas que sobrevivem à murcha bacteriana apresentam nanismo e amarelecimento das folhas murchas (GOTO, 1992).

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 (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Com relação ao controle químico da murcha bacteriana, este tem apresentado pouco sucesso (LOPES, 1994; TAKATSU; LOPES, 1997).

No contexto da proteção de plantas, a resistência induzida pode ser visualizada como uma das medidas de controle alternativo. Ela tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento, por exemplo, com fungos, bactérias e elicitores microbianos ou químicos (HAMMERSCHMIDT; KUAE, VAN LOON, 2001; PASCHOLATI, 2003). Este tipo de controle provavelmente se tornará um componente importante no manejo de doenças, principalmente daquelas onde os métodos atuais mostram-se pouco efetivos (PASCHOLATI, 2003).

Entre os diversos agentes bióticos existentes, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* têm sido pesquisados como potenciais agentes indutores de resistência, para o controle de doenças em plantas. Dentre as substâncias presentes no basidiocarpo e no micélio de *L. edodes* e *A. blazei*, a lentinana, uma glucana obtida a partir de *L. edodes*, protegeu plantas de maracujá contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, sem apresentar efeito direto sobre a bactéria, indicando que a proteção provavelmente ocorreu através da indução de resistência (PICCININ, 2000).

Em vista do uso potencial deste método de controle, já demonstrado por pesquisas anteriores, o presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a ação dos extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei* como indutores de resistência em plantas de berinjela contra a bactéria causadora da murcha;
- Investigar os mecanismos bioquímicos ativados na planta;
- Identificar o(s) princípio(s) ativo(s) existentes nos extratos que podem promover o efeito indutor.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

A redução da produção em uma lavoura pode ser ocasionada por diversos fatores, dentro os quais as doenças, sejam elas causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematóides. Estes fitopatógenos podem causar danos tanto na parte aérea como no sistema radicular, podendo levar a perda total da cultura. Como nem sempre é possível utilizar a resistência genética, o uso de

agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais freqüente. Porém, o uso contínuo desses defensivos pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes, bem como contaminar o ambiente, os alimentos, o homem e os animais (GHINI; KIMATI, 2000; MOTOYAMA et al., 2003).

Se o controle químico de fungos fitopatogênicos é por vezes questionado, primordialmente por motivos ecotoxicológicos e de saúde, para as bactérias é ainda mais problemático, pois os resultados são pouco eficientes, não merecendo confiança por parte do produtor. Resultados pouco satisfatórios não são geralmente divulgados, mas alguns deles evidenciam que o controle químico de certas bactérias, seja com cobre ou antibióticos, não atinge o nível desejado (MARINGONI et al., 1986; KUROZAWA; SAKAMOTO; KOYAMA, 1998). Entretanto, os patógenos que atacam as culturas, seja no campo ou em pós-colheita, podem ser controlados através de medidas alternativas, como o controle biológico e a indução de resistência. A indução de resistência em plantas vem sendo estudada desde o início do século XX (BERNARD, 1911 e CHESTER, 1933 apud ARAÚJO; ROBBS; RIBEIRO, 2003). Porém, apenas recentemente, a potencialidade de seu emprego no controle de enfermidades tem recebido o merecido destaque (GORLACH et al., 1996; OOSTENDORP et al., 2001).

A indução de resistência utiliza moléculas ou substâncias elicitoras, que podem ser de origem biótica ou abiótica, dentre as quais pode-se citar os extratos vegetais, os óleos essenciais, produtos químicos, cogumelos, entre outros (CIA, 2005; DI PIERO, 2003; MOTOYAMA et al., 2003; STANGARLIN et al., 1999, TOFFANO, 2005).

Os extratos aquosos dos cogumelos *A. blazei* e *L. edodes* possuem substâncias do tipo antibiótico e outras substâncias capazes de atuarem como elicitoras da resposta de resistência em plantas (local ou sistemicamente), mostrando-se assim potencialmente promissores no controle alternativo de fitopatógenos (EIRA et al., 2005).

Embora tenham sido publicados muitos trabalhos sobre compostos isolados de *L. edodes* com atividade antitumoral, anticancerígena e antiviral em humanos e animais, poucos trabalhos que tratam da atividade antibacteriana são encontrados. Em 1962, Venner et al. extraíram uma substância antibiótica do shiitake denominada cortinelina, a qual mostrou ter amplo espectro antibacteriano, sendo efetiva contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (VERNER, 1962 e VO, 1987 apud ISHIKAWA, 1998). Bianco Coletto (1981) obteve atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis* utilizando esta mesma substância.

A lentinana, um ativador do sistema imunológico, é outro composto encontrado em *L. edodes*, o qual teve efeito sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*, devido ao aumento da imunoproteção e não pela ação direta do composto sobre os microrganismos (JONG; BIRMINGHAM, 1993).

A atividade antibacteriana de *L. edodes* foi estudada *in vitro* por Ishikawa, Kasuya e Vanetti (2001), através da técnica de difusão em sobrecamada de agar semi-sólido. Os 35 isolados de *L. edodes* testados mostraram atividade antibacteriana 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. O mesmo efeito de inibição de crescimento *in vitro*, através do uso de *L. edodes*, foi verificado por Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Junior (1999), sobre diversas bactérias como *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*.

Poucos estudos têm sido conduzidos com o uso dos cogumelos na indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. Em um desses estudos, Di Piero e Pascholati (2004) verificaram que o extrato aquoso do isolado ABL 99/28 de *Agaricus 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. Verificou-se também um aumento da atividade de β -1,3-glucanases, sugerindo assim a indução de resistência em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*.

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Obtenção dos isolados 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 Profª Dra. Marli T. A. Minhoni. Utilizaram-se nos bioensaios os isolados Le-96/22 e Le-96/17 de *L. edodes*, obtidos de basidiocarpos produzidos em toras de eucalipto, e os isolados Abl-11 e Abl-28 de *A. blazei*, obtidos de cultivo axênico.

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

Para obtenção do extrato aquoso, 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 20.000g por 25 min. Para os bioensaios realizados em casa-de-vegetação, os extratos aquosos foram diluídos. Assim, o extrato aquoso a 10% v/v (10 mL de extrato bruto + 90 mL de água destilada) continha o equivalente a 7,15 mg de pó seco de basidiocarpo/mL. Para os testes realizados *in vitro*, os extratos aquosos foram filtrados em membrana tipo Millipore (diâmetro do poro = 0,2 µm), sob condições assépticas, sendo posteriormente armazenados em geladeira até serem usados.

2.2.2.3 Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas

O isolado Rs84 de *Ralstonia solanacearum* foi cedido pelo pesquisador Dr. Carlos Lopes, do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa. Para a realização dos ensaios, o isolado foi cultivado no meio de tetrazólio (KELMAN, 1954), cuja composição apresenta glicerol (5,0 mL), peptona (10 g), caseína (1 g), ágar (18 g), cloreto de tetrazólio 1% (5,0 mL), água destilada para completar 1 litro e pH 6,8-7,0, ajustado com NaOH, e em meio nutriente-agar (NA). O isolado bacteriano foi preservado em tubos de ensaio contendo o meio NA coberto por óleo mineral esterilizado e em água destilada esterilizada (WAKIMOTO et al., 1982). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em temperatura ambiente ou na geladeira.

Em todos os bioensaios, buscou-se a uniformidade das plantas de berinjela (*Solanum melongena* L.) utilizando o Hib. F1 Napolitana, cujas sementes foram cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda, através do Engenheiro Agrônomo Msc. Robert Wierzbicki. 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.

2.2.2.4 Obtenção do inóculo bacteriano

O isolado bacteriano Rs84 foi repicado para placas de Petri contendo meio NA ou meio de tetrazólio, sendo incubado no escuro por 48 h a 28±2°C. Após o crescimento das colônias, foram preparadas as suspensões bacterianas em água destilada, ajustando-se a concentração para 10⁸ ufc/mL, em espectrofotômetro (0,1 de absorvância em comprimento de onda de 550 nm).

2.2.2.5 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* (Le-96/17 e Le-96/22) e *A. blazei* (Abl-11 e Abl-28), obtendo-se concentrações finais de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). O tratamento controle foi representado por tubos contendo somente água. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de uma suspensão bacteriana de *R. solanacearum* em cada tubo, de modo que a concentração final em cada tubo fosse de 10^8 ufc/mL. O volume final de cada tubo foi de 10 mL, com cinco repetições por tratamento, onde cada tubo representou uma repetição.

Os tubos contendo os extratos com a suspensão bacteriana foram mantidos no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Ao final deste período, alíquotas de 300 μL de cada tubo foram pipetadas em placas de Petri contendo o meio NA, onde foram espalhadas por toda a superfície do meio, com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram novamente mantidas no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$, por 48 h. A avaliação dos resultados foi efetuada em espectrofotômetro. Para isto, 20 mL de água destilada foram colocados em cada placa, sendo feita a leitura da concentração desta suspensão bacteriana a 550 nm, obtendo-se como resultado o valor da unidade de absorvância (U.A.) por mL. Este ensaio foi realizado em duplicata.

2.2.2.6 Proteção de plantas em casa-de-vegetação

Sementes de berinjela Hib. F1 Napolitana foram semeadas em bandejas de poliestireno, contendo substrato agrícola Plantmax[®] (Eucatex), e mantidas em casa-de-vegetação até sua utilização. As plantas de berinjela foram inicialmente transplantadas para vasos contendo substrato esterilizado composto de solo, esterco de curral e areia. Quando as plantas apresentaram um par de folhas definitivas totalmente expandidas, 10 ml de água, dos extratos aquosos dos cogumelos ou de acibenzolar-S-metil (Bion[®], Syngenta) foram aspergidos sobre as plantas 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 μL da suspensão bacteriana (10^8 ufc/mL), que estava depositada na axila foliar (MORGADO; LOPES; TAKATSU, 1994). Foram realizadas 10 repetições/tratamento, onde cada planta representou uma repetição. O delineamento experimental foi do tipo completamente casualizado. As avaliações foram feitas no 5º e 10º dias após a inoculação, através da porcentagem de folhas

murchas, peso fresco e seco das plantas. Os tratamentos conduzidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tratamentos com água, 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
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs84
T3	Abl-11	5% (v/v)	Rs84
T4	Abl-11	10% (v/v)	Rs84
T5	Abl-11	15% (v/v)	Rs84
T6	Abl-11	20% (v/v)	Rs84
T7	Le-96/17	5% (v/v)	Rs84
T8	Le-96/17	10% (v/v)	Rs84
T9	Le-96/17	15% (v/v)	Rs84
T10	Le-96/17	20% (v/v)	Rs84
T11	Le-96/22	5% (v/v)	Rs84
T12	Le-96/22	10% (v/v)	Rs84
T13	Le-96/22	15% (v/v)	Rs84
T14	Le-96/22	20% (v/v)	Rs84
T15	Abl-28	5% (v/v)	Rs84
T16	Abl-28	10% (v/v)	Rs84
T17	Abl-28	15% (v/v)	Rs84
T18	Abl-28	20% (v/v)	Rs84
T19	aSm	0,05 g/L	Rs84

2.2.2.7 Obtenção dos extratos proteicos

Os tratamentos que promoveram os melhores resultados no controle da murcha bacteriana foram utilizados em novo ensaio, a fim de se determinar possíveis alterações na atividade de algumas enzimas. Os procedimentos para obtenção de plantas, de inóculo e o método de inoculação foram idênticos àqueles adotados nos ensaios do item 2.2.2.6. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, onde cada planta representou uma repetição. Os tratamentos realizados podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2 – Tratamentos com água, 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
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs84
T3	aSm	0,05 g/L	Água
T4	aSm	0,05 g/L	Rs84
T5	Abl-28	15% (v/v)	Água
T6	Abl-28	15% (v/v)	Rs84
T7	Abl-11	15% (v/v)	Água
T8	Abl-11	15% (v/v)	Rs84

As amostragens foram feitas aos 0, 1, 2, 3, 4, 7 e 12 dias após os tratamentos. Todas as folhas de cada planta foram coletadas, pesadas e armazenadas em congelador a -20°C . As amostras coletadas foram maceradas e homogeneizadas em 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) com o auxílio de um almofariz, sendo 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 atividades de quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase.

2.2.2.8 Dosagem de proteínas totais

O conteúdo total de proteínas das amostras foi determinado através do método de Bradford (1976). Em 800 μL de sobrenadante, obtido como descrito acima, adicionou-se 200 μL de reagente concentrado de Bradford, sendo que após 10 min realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em μg equivalentes de albumina de soro bovino (ASB) em 800 μL de amostra, foi determinada utilizando-se uma curva padrão de ASB, variando de 0 a 25 $\mu\text{g}\cdot 0,8\text{ mL}^{-1}$.

2.2.2.9 Atividade de peroxidase

A atividade da 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 μL de guaiacol e 306 μL 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).

2.2.2.10 Atividade de quitinase

Para avaliar a atividade de quitinase utilizou-se a metodologia descrita por Wirth e Wolf (1990), 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 a 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).

2.2.2.11 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada de acordo com Duangmal e Aparenten (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 µL do substrato foram misturados com 100 µL do extrato proteico. As leituras foram feitas a 420 nm em espectrofotômetro, durante um período de 1 min, a cada 10 s. 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.

2.2.2.12 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha

100 µL do extrato proteico misturado com 400 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e com 500 µL 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 absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (o controle correspondia a uma mistura contendo 100 µL do extrato proteico e 900 µL de tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico / min / mg de proteína, utilizando uma curva padrão para o ácido.

2.2.2.13 Separação através de precipitação dos componentes das preparações com atividade biológica

O extrato aquoso Abl-28, que proporcionou a melhor proteção das plantas no patossistema berinjela/*Ralstonia*, foi submetido a procedimentos para a separação das proteínas presentes, através da precipitação com sulfato de amônio. A precipitação foi realizada utilizando 100 mL de filtrado bruto do extrato em saturações de 0-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%. Para evitar a desnaturação das proteínas, o sal foi dissolvido gradativamente, com a suspensão mantida a temperatura de 10°C. Após a dissolução total do sal, os filtrados permaneceram em repouso durante 1 h a 10°C, sendo posteriormente centrifugados a 5.000g/35 min. Cada precipitado foi resuspenso em 4 mL de água destilada, dialisado contra água destilada e tiveram seu volume final ajustado com água destilada para 10 mL. As amostras dialisadas foram utilizadas em bioensaio.

2.2.2.14 Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio

As plantas de berinjela foram inicialmente transplantadas para vasos contendo substrato esterilizado composto de solo, esterco de curral e areia, conforme já mencionado. Quando as plantas apresentaram um par de folhas definitivas totalmente expandidas, água, acibenzolar-S-metil (0,05 g/L), o extrato aquoso bruto do Abl-28, bem com suas frações originadas da precipitação, foram aspergidos sobre as plantas, de acordo com os tratamentos na Tabela 3. Após dois dias, as plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana de *R. solanacearum* (Rs84). O método de inoculação utilizado já foi descrito anteriormente, no item 2.2.2.6. Foram realizadas 10 repetições/tratamento, em um delineamento experimental completamente casualizado, sendo avaliada a porcentagem de folhas murchas, o peso fresco e o peso seco das plantas. As avaliações foram efetuadas aos 5 e 10 dias após a inoculação.

Tabela 3 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm), com o extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* (Abl-28) e suas frações obtidas através da precipitação em sulfato de amônio. As plantas de berinjela foram inoculadas com *R. solanacearum* (Rs84) dois dias depois de tratadas

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs84
T3	aSm	0,05 g/L	Rs84
T4	Abl-28	15% (v/v)	Rs84
T5	Abl-28 fração 0-40%	-	Rs84
T6	Abl-28 fração 40-60%	-	Rs84
T7	Abl-28 fração 60-80%	-	Rs84
T8	Abl-28 fração 80-100%	-	Rs84

2.2.2.15 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica

O material com atividade biológica, obtido através da precipitação com sulfato de amônio, que foi capaz de reduzir a murcha bacteriana em berinjela, foi submetido à cromatografia de troca aniônica (CTA), utilizando-se uma coluna de vidro preenchida com resina de troca iônica DietilaminoetilCelulose (DEAE-Celulose; Sigma[®]). Todo material submetido à cromatografia foi filtrado em filtro tipo Milipore (diâmetro do poro = 0,2 µm) e degaseificado com o auxílio de bomba de vácuo por 20 min. Para tanto, uma amostra de 4,5 ml do precipitado (saturação 60-80%) de Abl-28 foi aplicada no leito da coluna e eluída com tampão fosfato 25 mM (pH 6,0), em fluxo de 3,0mL/min. Após eluição de 100 mL do tampão, o material adsorvido à resina foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”. As frações coletadas foram agrupadas de acordo com o perfil de proteínas, dialisadas contra água destilada, concentradas com polietileno glicol 20.000, até se obter um volume final de 20 mL. Estas frações foram utilizadas em novo bioensaio.

2.2.2.16 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia

As plantas de berinjela foram tratadas novamente com aSm (0,05 g/L), com o extrato aquoso do Abl-28 e com as frações obtidas na CTA, quando estas apresentaram um par de folhas definitivas totalmente expandidas. A inoculação da bactéria foi efetuada conforme Morgado et al. (1994), em casa-de-vegetação, com 10 repetições/tratamento, em delineamento experimental completamente casualizado. Foram avaliados a porcentagem de folhas murchas, o peso fresco e

seco das plantas, sendo que as avaliações ocorreram aos 5 e 10 dias após a inoculação. Os tratamentos podem ser visto na Tabela 4.

Tabela 4 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm), com o extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* (Abl-28) e suas frações obtidas na cromatografia de troca aniônica (CTA). As plantas de berinjela foram inoculadas com *R. solanacearum* (Rs84) dois dias depois de tratadas.

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs84
T3	aSm	0,05 g/L	Rs84
T4	Abl-28	15% (v/v)	Rs84
T5	Abl-28 1ª fração	-	Rs84
T6	Abl-28 2ª fração	-	Rs84
T7	Abl-28 3ª fração	-	Rs84
T8	Abl-28 4ª fração	-	Rs84
T9	Abl-28 5ª fração	-	Rs84

2.2.2.17 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas

O precipitado 60-80% de Abl-28 e as frações proteicas obtidas na CTA foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante descontínuo, de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (1970). O gel separador foi preparado na concentração de 10% de acrilamida e o gel concentrador na concentração de 4%, sendo a eletroforese conduzida sob voltagem de 90V a 4°C, por um período de 2,5 h.

Após preparar o gel, 20 µL de cada amostra foram misturados em tubos tipo eppendorf com 20 µL de tampão desnaturante [62,5 mM de fosfato de sódio pH 7,0; glicerol 10% (v/v); SDS 2% (m/v); azul de bromofenol 0,001% (m/v)], sendo estes tubos aquecidos em banho-maria por 5 min e posteriormente as amostras aplicadas nos pocinhos do gel.

Com o término da eletroforese, o gel foi retirado e imerso em solução corante [azul de comassie R250 1% (m/v); etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v)], permanecendo 12 h sob agitação. O gel foi então lavado com água destilada e imerso em solução descorante [etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v); água destilada 40% (v/v)], permanecendo sob agitação por um período de 4 h, sendo realizadas três trocas da solução descorante.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Efeito *in vitro* dos cogumelos sobre *Ralstonia solanacearum*

Apenas no segundo teste *in vitro* (Figura 2) os isolados Abl-28, na concentração de 10%, e Abl-11, nas concentrações de 5% e 20%, apresentaram efeito na diminuição do crescimento da bactéria, quando comparado com os demais tratamentos. Porém, essa diminuição no crescimento não ocorreu na repetição do teste (Figura 1), não sendo possível comprovar o efeito direto dos isolados Abl-28 10% e Abl-11 5% e 20% no crescimento da bactéria. Alguns tratamentos até estimularam o crescimento da bactéria.

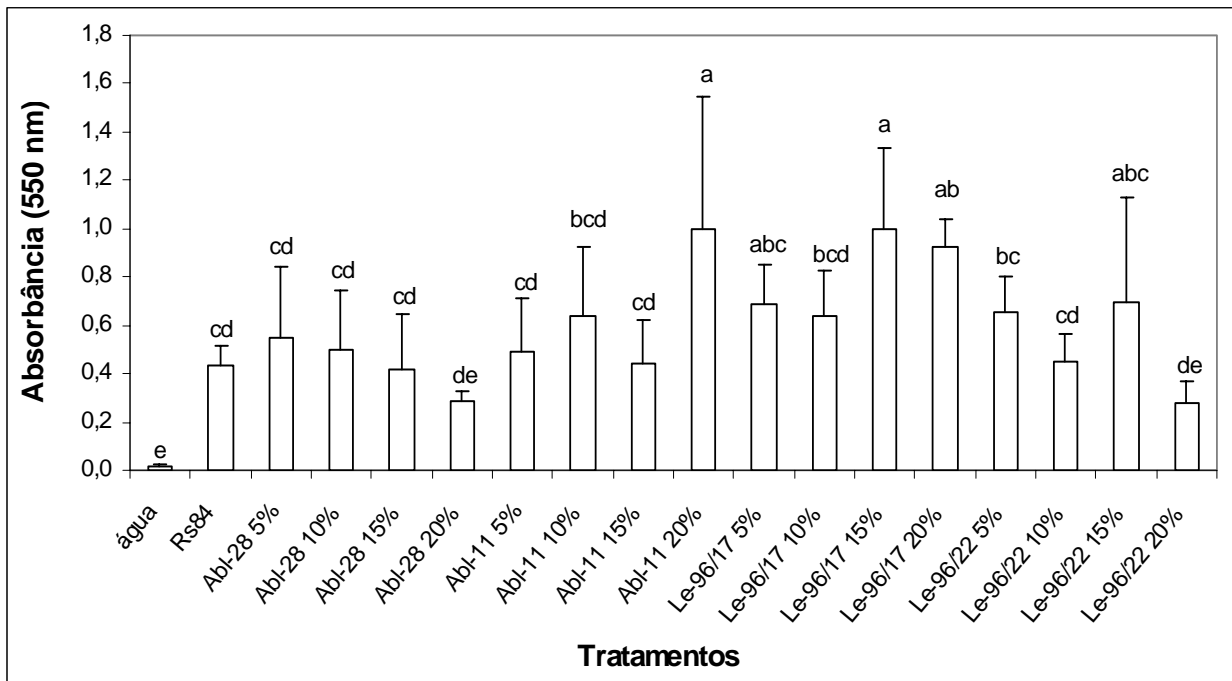


Figura 1 – Efeito direto dos extratos aquosos de basidiocarpos de *Agaricus blazei* (isolados Abl-28 e Abl-11) e de *Lentinula edodes* (isolados Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum* (Rs84), no primeiro teste *in vitro*. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela água e Rs84

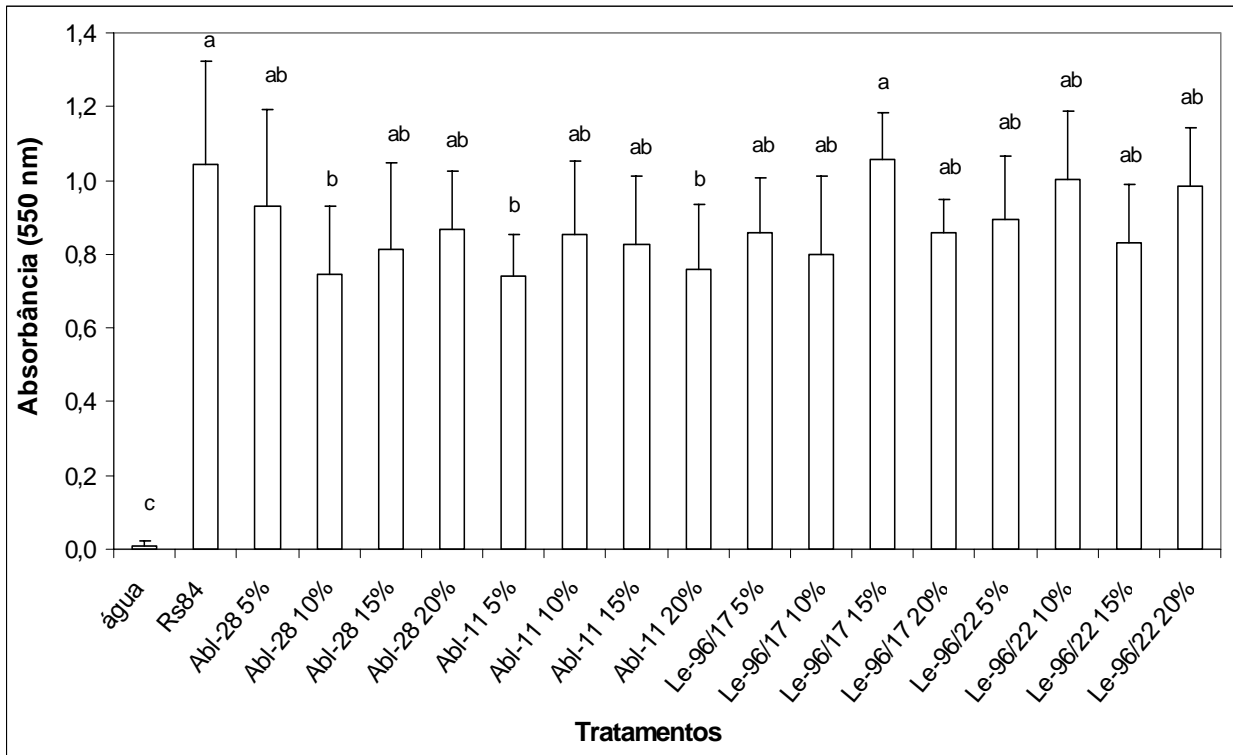


Figura 2 – Efeito direto dos extratos aquosos de basidiocarpos de *Agaricus blazei* (isolados Abl-28 e Abl-11) e de *Lentinula edodes* (isolados Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum* (Rs84), no segundo teste *in vitro*. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela água e Rs84

2.2.3.2 Proteção de plantas em casa-de-vegetação

O experimento realizado em casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de berinjela contra *R. solanacearum*, utilizando o indutor acibenzolar-S-metil e os extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*, foi realizado em duplicata. Os resultados obtidos nos dois experimentos foram semelhantes, sendo apresentado abaixo os resultados de apenas um dos experimentos.

Os resultados da Figura 3 mostram que o extrato aquoso Abl-28, nas concentrações utilizadas, proporcionou a menor porcentagem de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos. O tratamento com acibenzolar-S-metil e com os demais extratos aquosos de cogumelos também proporcionaram uma menor porcentagem de folhas murchas em comparação as plantas tratadas com água e inoculadas com a bactéria (tratamento Rs84).

Quando analisamos o efeito dos tratamentos sobre o peso fresco e seco das plantas de berinjela (Figura 4), os extratos aquosos de Abl-11 20% e Le-96/17 5% proporcionaram pesos semelhantes ao das plantas tratadas somente com água.

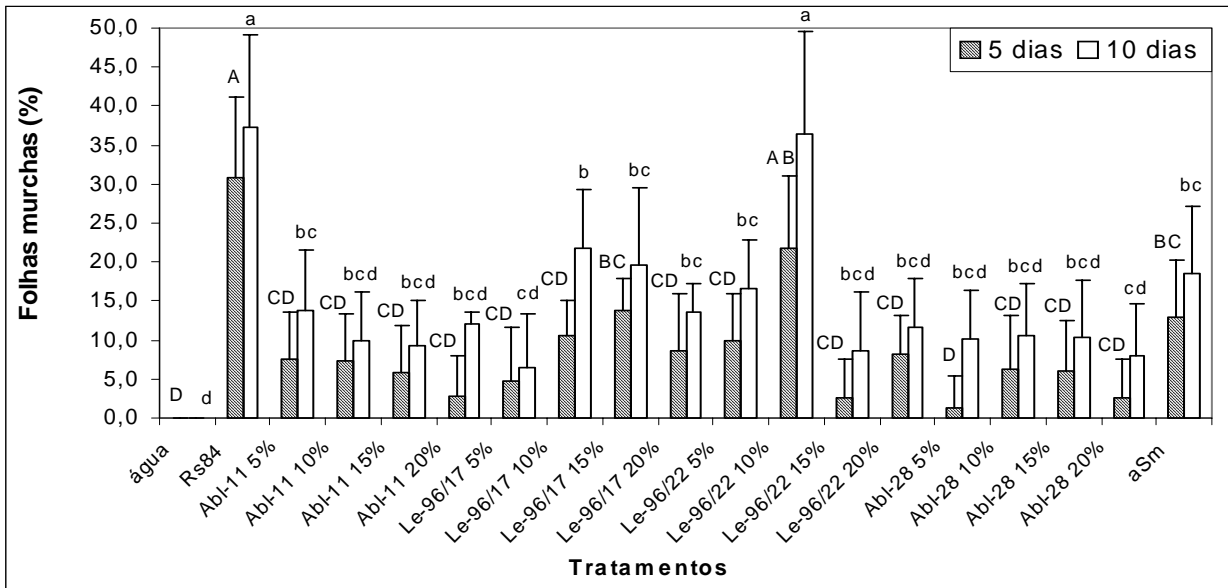


Figura 3 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-11 e Abl-28) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre a ocorrência de folhas murchas, causado por *Ralstonia solanacearum* (Rs84). As barras representam a média \pm desvio 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

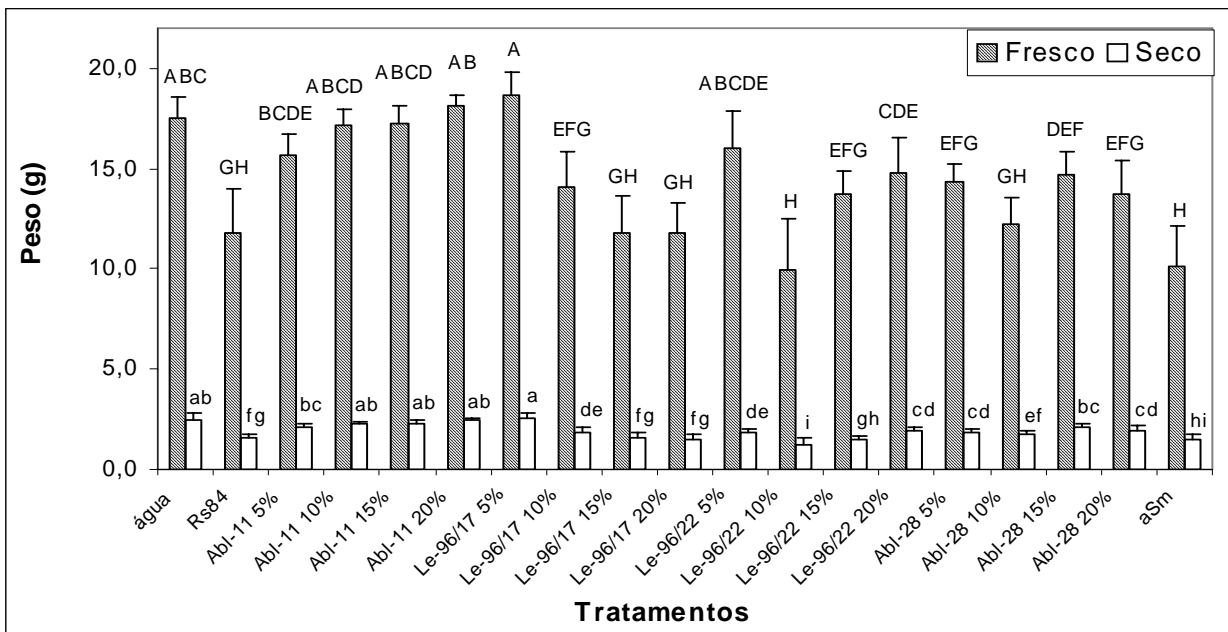


Figura 4 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-11 e Abl-28) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o peso fresco e seco das plantas de berinjela. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se ao peso fresco dos tratamentos e as letras minúsculas referem-se ao peso seco dos tratamentos. Os tratamentos controle são representados pela água e Rs84

2.2.3.3 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática

Quando analisamos estatisticamente somente o efeito dos tratamentos indutores, sem a inoculação com a bactéria, podemos observar que ocorreu um aumento na quantidade de proteínas nas plantas de berinjela no 1º, 3º e 4º dias após os tratamentos, com relação ao tratamento Água (Figura 5 A). Somente o tratamento Abl-11 diferiu estatisticamente do tratamento Água do 1º ao 12º dias após o tratamento.

Apesar do Abl-11 proporcionar um maior acúmulo na quantidade de proteínas, o mesmo não se repetiu na atividade de peroxidase e quitinase, onde apenas o indutor aSm diferiu significativamente dos demais tratamentos a partir do 3º dia após o tratamento, para peroxidase e a partir do 4º dia após o tratamento, para quitinase (Figuras 5 B e 5 C). Por sua vez, o Abl-28 diferiu dos demais tratamentos, junto com aSm, apenas no 12º dia após o tratamento.

Quando analisamos a atividade de fenilalanina amônia-liase, o Abl-28 diferiu do tratamento Água no 3º, 7º e 12º dia após o tratamento (Figura 5 D). Todos os tratamentos com os indutores diferiram do tratamento Água no 12º dia após o tratamento. Resultado semelhante foi observado na atividade de polifenoloxidase, onde os tratamentos aSm e Abl-28 diferiram dos demais somente no 12º dia após o tratamento (Figura 5 E).

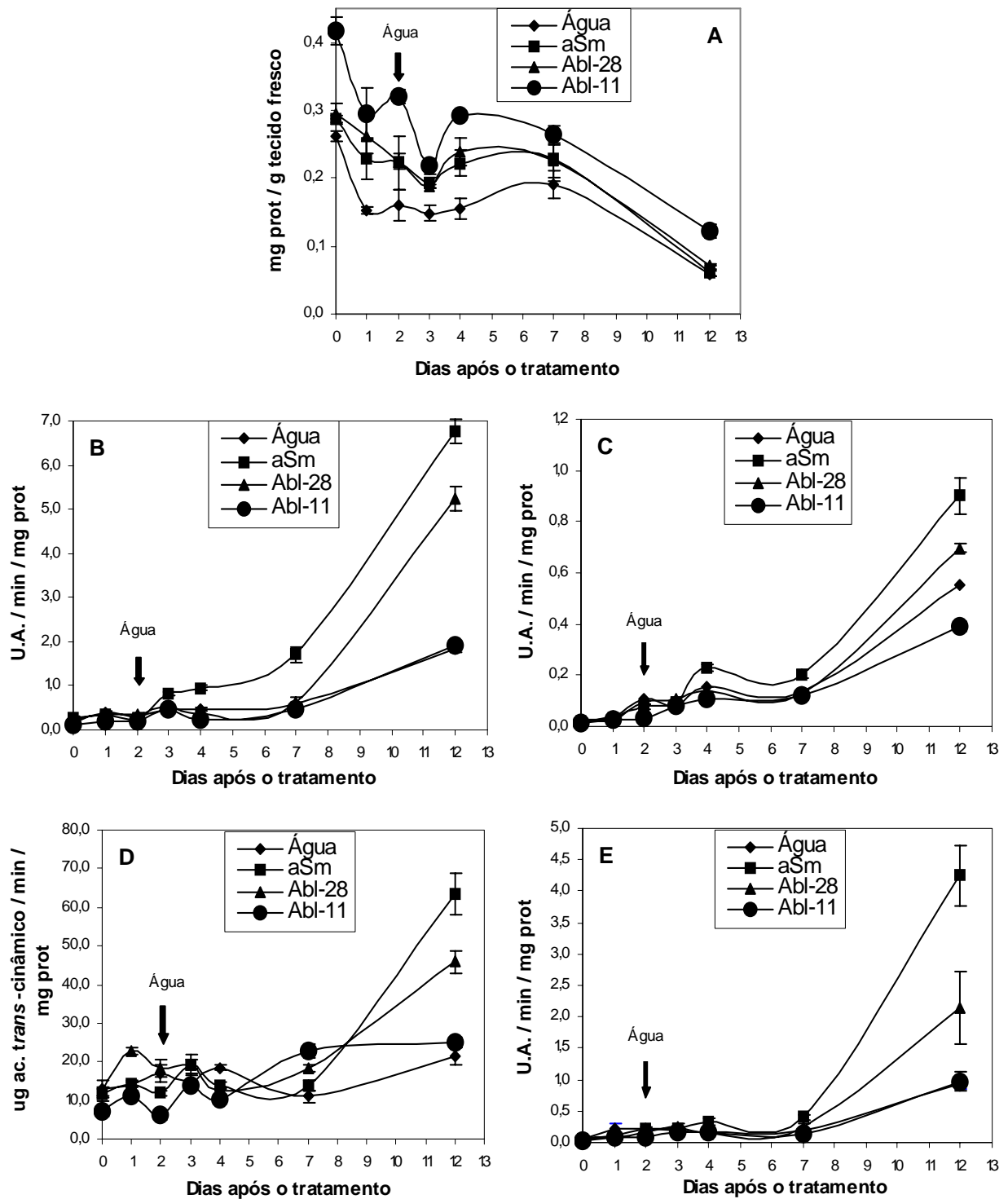


Figura 5 – Concentração de proteínas (A) e atividade das enzimas peroxidase (B), quitinase (C), fenilalanina amônia-liase (D) e polifenoloxidase (E), em folhas de berinjela, em resposta à aplicação dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-28 e Abl-11) e do indutor acibenzolar-S-metil (aSm). A seta indica o momento do tratamento com água, dois dias após o tratamento com os indutores. Barras representam à média \pm desvio padrão

Já na comparação dos tratamentos, com a inoculação da bactéria, foi possível observar que na quantidade de proteínas, o tratamento Abl-11 diferiu significativamente em relação às plantas tratadas com Água até o 4º dia após o tratamento (Figura 6 C). Para os indutores aSm e Abl-28, inoculados com Rs84, foi possível observar diferenças significativas em relação as plantas tratadas com Água no 3º ao 12º dias após o tratamento, no caso do aSm-Rs84 (Figura 6 A) e no 1º, 2º, 4º e 12º dias após o tratamento, no caso de Abl-28-Rs84 (Figura 6 B).

Avaliando a atividade de peroxidase, foi possível observar que as plantas tratadas com aSm e inoculadas com Rs84 tiveram uma atividade maior que as plantas tratadas com Água no 4º e 7º dias após o tratamento (Figura 6 D). Esta diferença significativa na atividade de peroxidase em relação às plantas tratadas com Água também ocorreu no tratamento Abl-11-Rs84, porém, no 4º e no 12º dias após o tratamento (Figura 6 F). Quando analisamos o efeito do tratamento Abl-28-Rs84 em relação ao tratamento Água-Rs84 (Figura 6 E), podemos observar que ocorrem diferenças significativas no 7º e 12º dias após o tratamento, sendo também possível observar uma elevação na atividade aos 3 dias após o tratamento, que seria o 1º dia após a inoculação com a bactéria, porém, não significativamente diferente.

Todos os tratamentos indutores, inoculados com Rs84, não mostraram diferenças significativas sobre a atividade de quitinase em relação às plantas tratadas com Água, mostrando que os indutores não tiveram nenhum efeito na atividade de quitinase. Foi possível observar, em alguns tempos de coleta, um efeito de “inibição” ou “diminuição” na atividade de quitinase nas plantas tratadas com os indutores e inoculadas com Rs84. Este efeito para os tratamento aSm e Abl-28 é ilustrado nas Figura 7 A e 7 B. A mesma situação ocorreu na avaliação de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (Figuras 7 C, 7 E e 7 F), exceto para o tratamento Abl-11-Rs84, onde foi possível observar um aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase no 7º e 12º dias após o tratamento (Figura 7 D), em relação às plantas tratadas com Água.

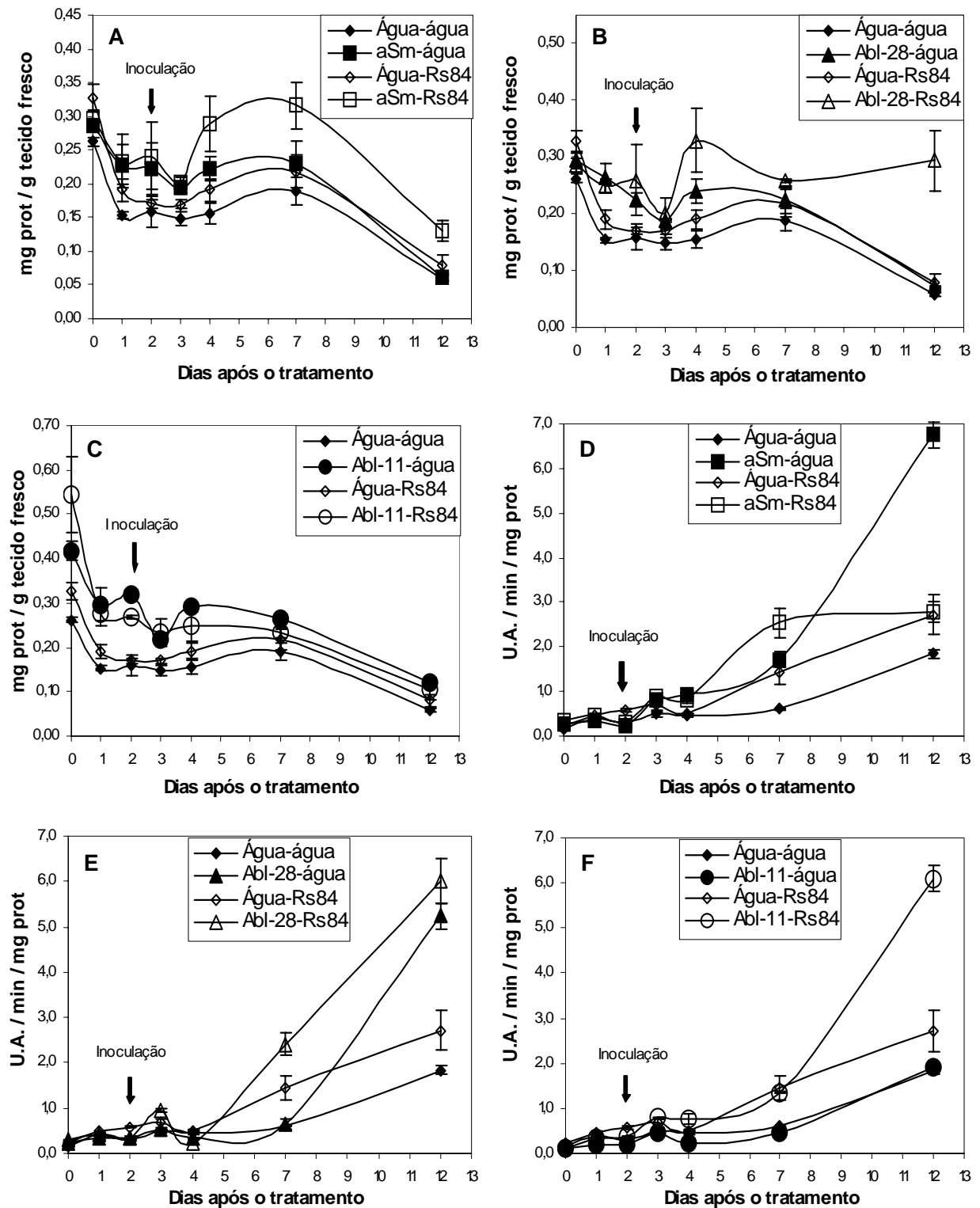


Figura 6 – Concentração de proteínas em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-28 (B) e Abl-11 (C) e atividade de peroxidase após o tratamento com aSm (D), Abl-28 (E) e Abl-11 (F), nas folhas de berinjela. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs84), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

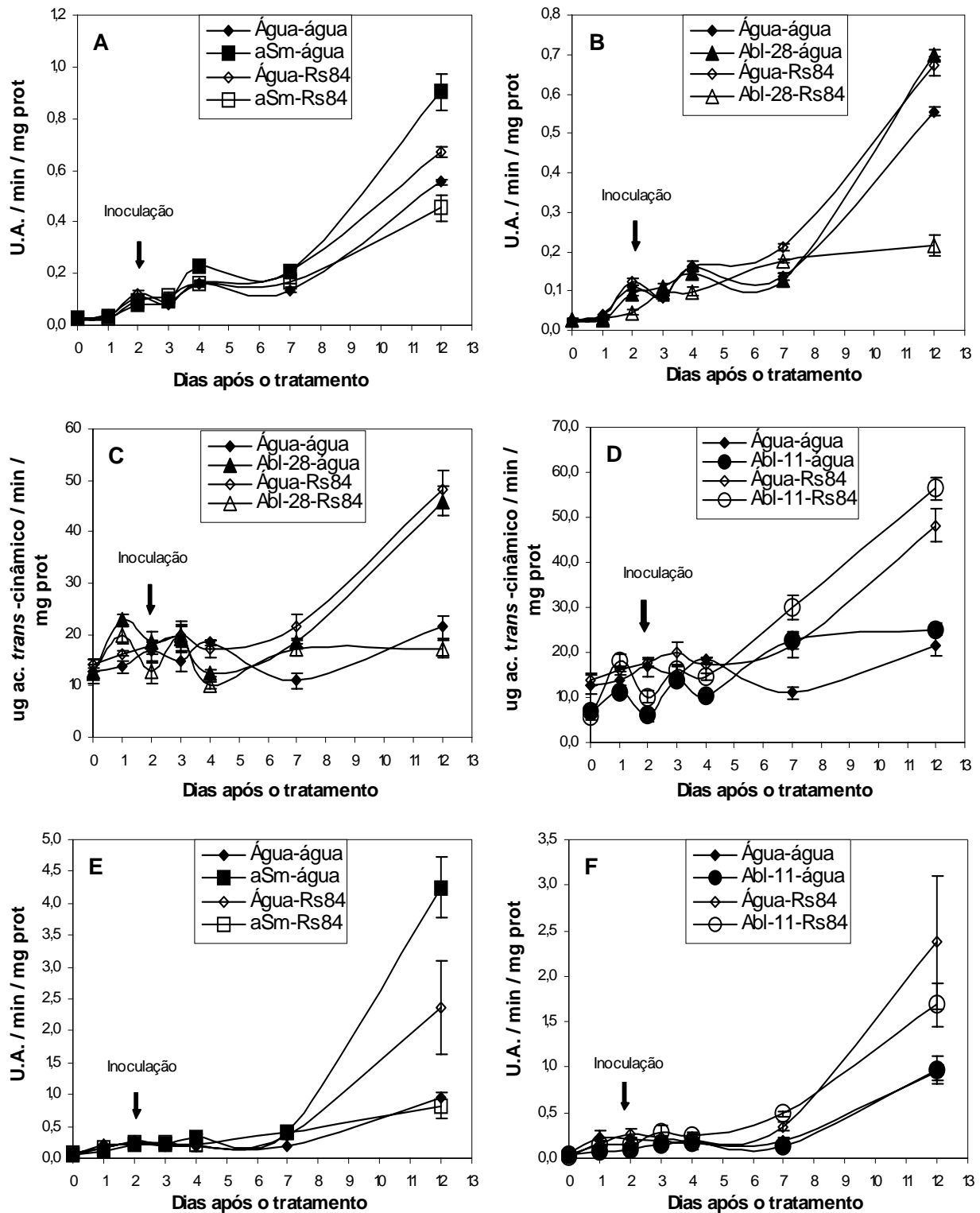


Figura 7 – Atividades de quitinase, após o tratamento com de aSm (A) e com o extrato aquoso Abl-28 (B) de *Agaricus blazei*, de fenilalanina amônia-liase, após o tratamento com Abl-28 (C) e Abl-11 (D) e de polifenoloxidase, após o tratamento com aSm (E) e Abl-11 (F), nas folhas de berinjela. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs84), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

2.2.3.4 Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio

Aplicando-se o extrato aquoso de basidiocarpos de Abl-28, bem como suas frações da precipitação e o indutor acibenzolar-S-metil (aSm), com intervalo de 2 dias entre a aplicação dos tratamentos e a inoculação, foi possível observar uma menor ocorrência de folhas murchas no tratamento com a fração 60-80% de Abl-28 (Figura 8), tanto aos 5 como aos 10 dias após a inoculação. O tratamento com o extrato aquoso bruto de Abl-28 e aSm também promoveram redução na ocorrência de folhas murchas, em relação ao tratamento Rs84.

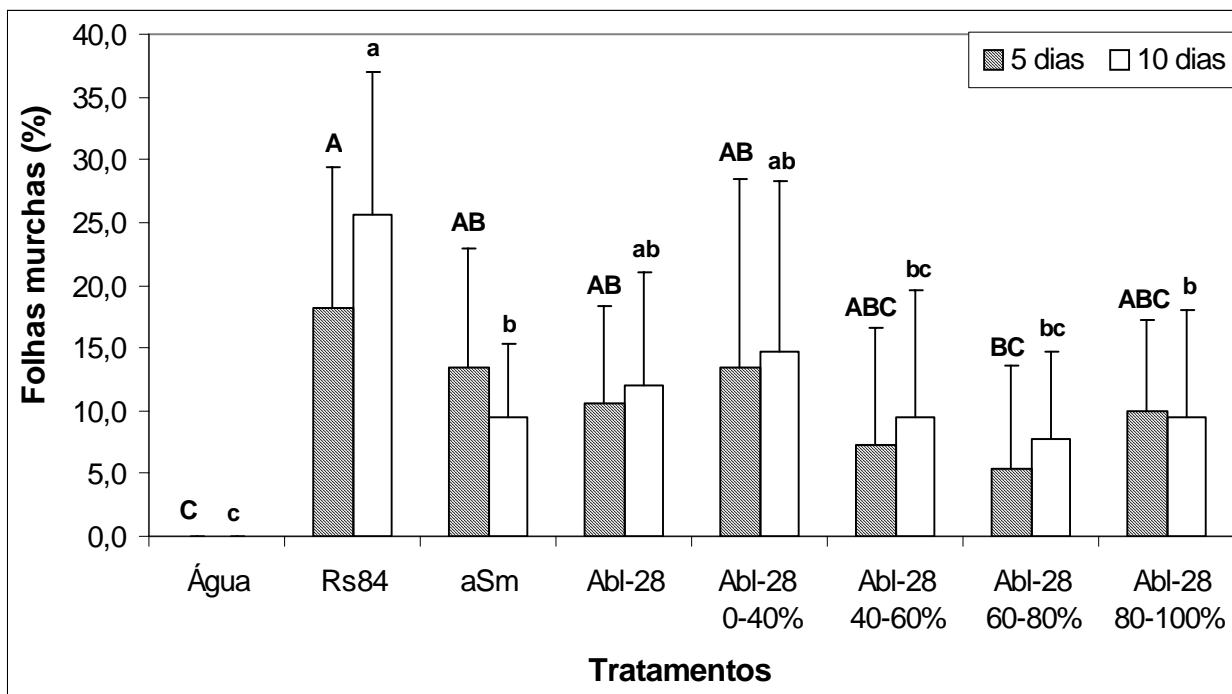


Figura 8 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (Abl-28) e de suas frações precipitadas com sulfato de amônio (Abl-28 0-40%; Abl-28 40-60%; Abl-28 60-80%; Abl-28 80-100%) sobre a ocorrência de folhas murchas de berinjela, causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs84). 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

Quando analisamos o efeito dos tratamentos em relação ao peso fresco das plantas de berinjela, plantas tratadas com aSm tiveram o maior peso, seguidas de perto pelos tratamentos Água, Abl-28 40-60% e Abl-28 80-100%. No peso seco, os tratamentos aSm, Abl-28 40-60% e Abl-28 80-100% continuaram diferindo estatisticamente do tratamento Rs84 (Figura 9).

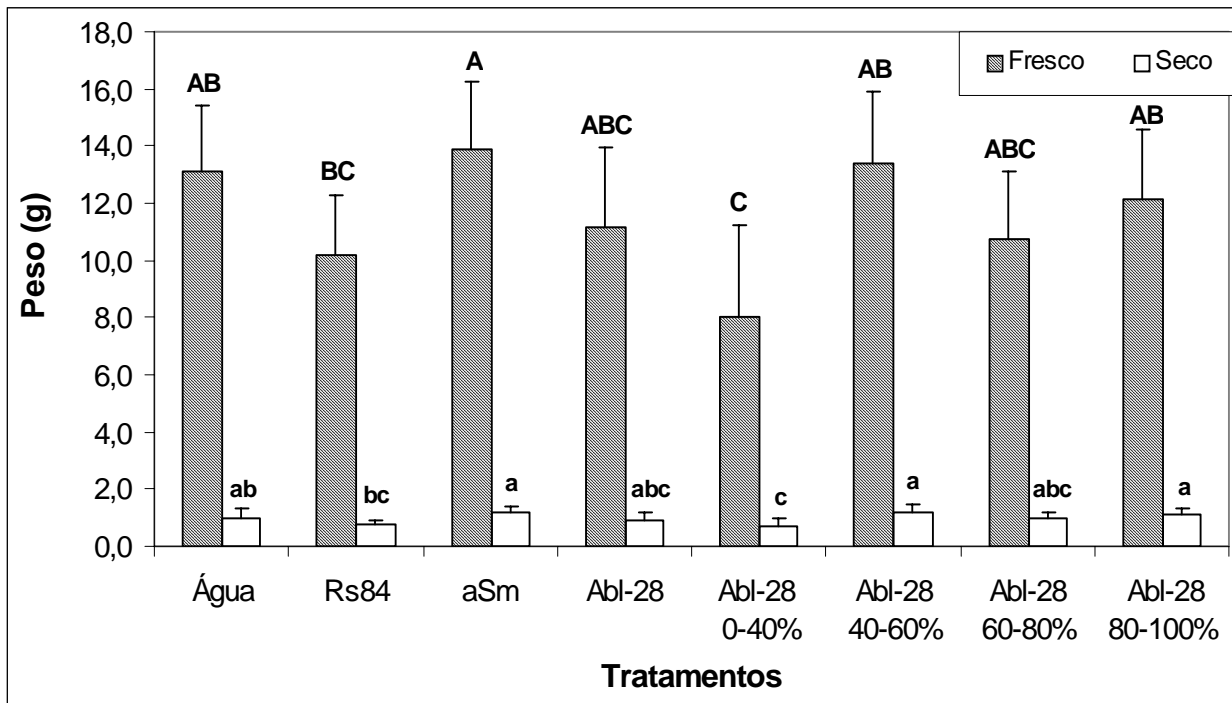


Figura 9 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (Abl-28) e de suas frações precipitadas com sulfato de amônio (Abl-28 0-40%; Abl-28 40-60%; Abl-28 60-80%; Abl-28 80-100%) sobre o desenvolvimento das plantas de berinjela. Avaliação efetuada com base no peso fresco e seco. 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 ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco

2.2.3.5 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica

O extrato aquoso de Abl-28, bem como sua fração 60-80% da precipitação em sulfato de amônio, foram os tratamentos que proporcionaram a maior redução na ocorrência de folhas murchas de berinjela. Desse modo, o precipitado 60-80% foi submetido à cromatografia de troca aniônica (CTA), em tampão fosfato 25 mM (pH 6,0). Após o procedimento denominado de “step wise”, foram obtidas cinco frações na cromatografia, ocorrendo uma maior absorvância a 280 nm na fração 4 (Figura 10). A cromatografia do precipitado 60-80% de Abl-28 foi realizada mais de uma vez, obtendo-se frações semelhantes. As frações da CTA foram concentradas até se obter um volume de 20 mL, com o uso de polietileno glicol 20.000, sendo posteriormente utilizadas em bioensaio com plantas de berinjela contra *R. solanacearum*.

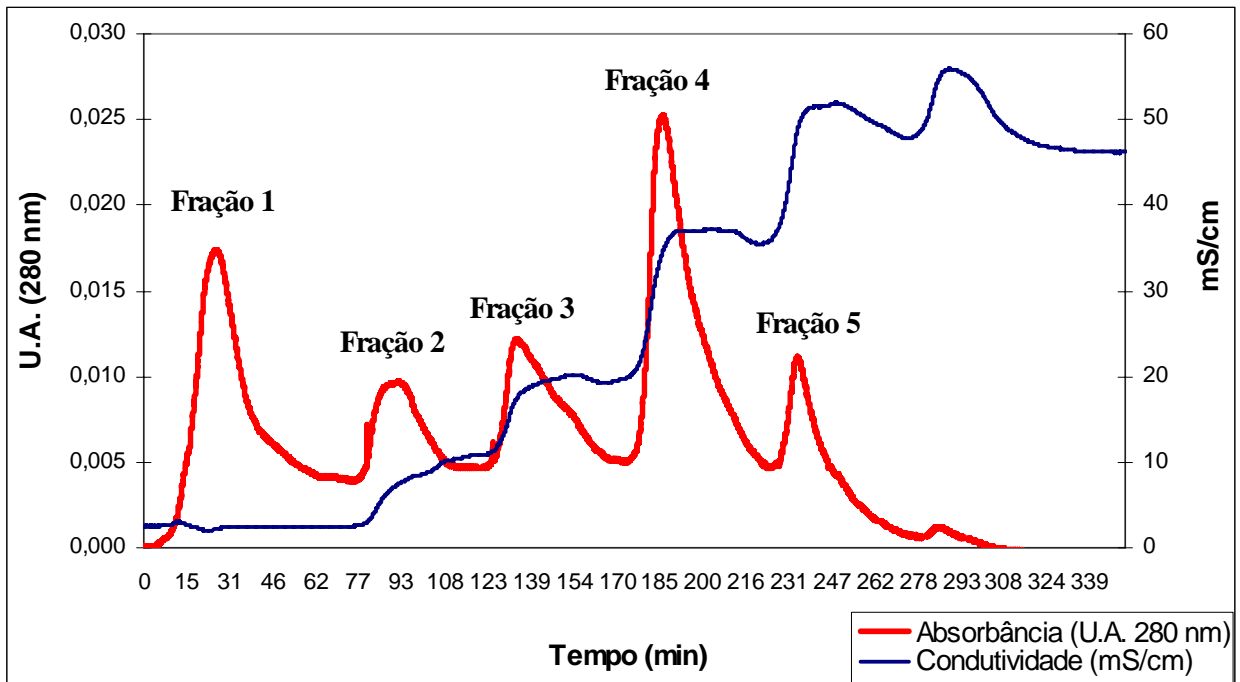


Figura 10 – Cromatografia de troca aniônica do precipitado 60-80%, obtido a partir do extrato aquoso de basidiocarpos de *Agaricus blazei* (Abl-28), submetido ao tratamento com sulfato de amônio. O material foi aplicado em coluna preenchida com DEAE-Celulose e a cromatografia efetuada com tampão fosfato 25 mM (pH 6,0), em fluxo de 3,0 mL/min. O material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento denominado “step wise”

2.2.3.6 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia

Depois de obtidas as frações na CTA, estas foram aplicadas em plântulas de berinjela, visando verificar o efeito na redução da murcha bacteriana. As avaliações em todos os experimentos foram realizadas aos 5 e 10 dias, após a inoculação com Rs84. Entretanto, neste experimento não ocorreram sintomas de murcha na primeira avaliação, sendo que os resultados observados na Figura 11 são apenas da segunda avaliação, aos 10 dias após a inoculação. Foi possível observar que a fração 4 da CTA, bem como o extrato aquoso de Abl-28, promoveram a menor ocorrência de folhas murchas de berinjela, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. A fração 4 é a que apresenta maior absorbância a 280 nm dentre todas, como visto na Figura 10.

Com relação ao peso fresco e peso seco, a fração 4, o tratamento Água e a fração 2 foram os tratamentos que promoveram o maior peso das plantas de berinjela, diferindo estatisticamente do tratamento Rs84 (Figura 12).

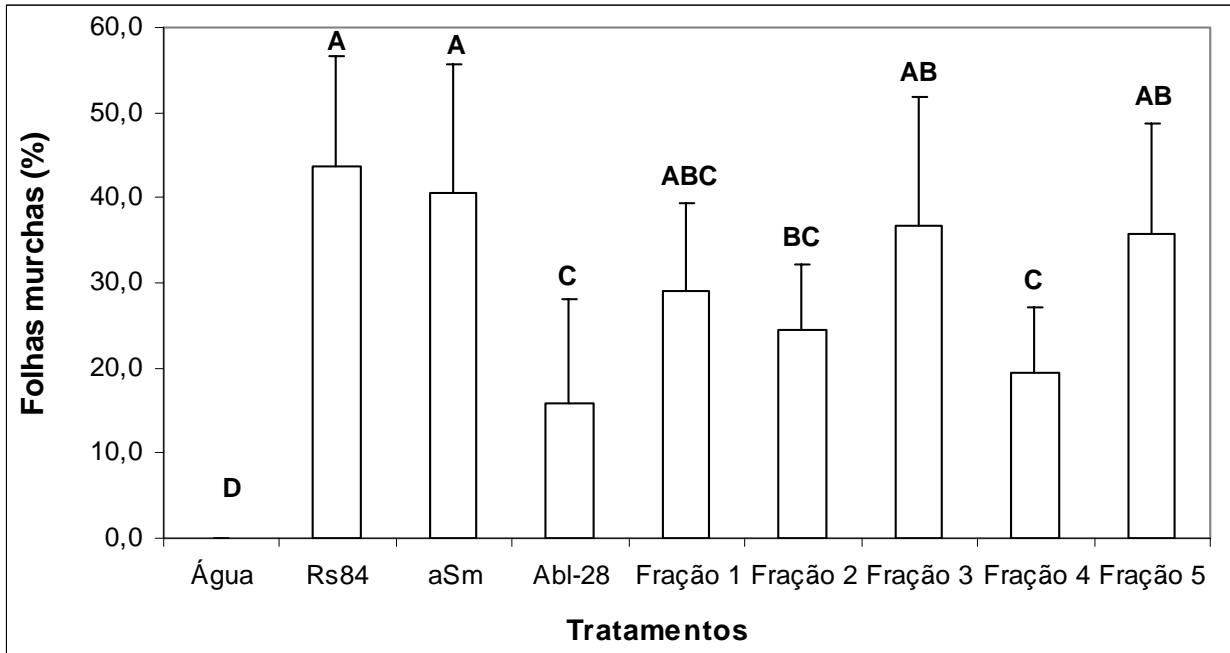


Figura 11 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (Abl-28) e suas frações obtidas através da cromatografia de troca aniônica (CTA) sobre a ocorrência de folhas murchas, causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs84). As barras representam à média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. A avaliação ocorreu 10 dias após a inoculação com a bactéria

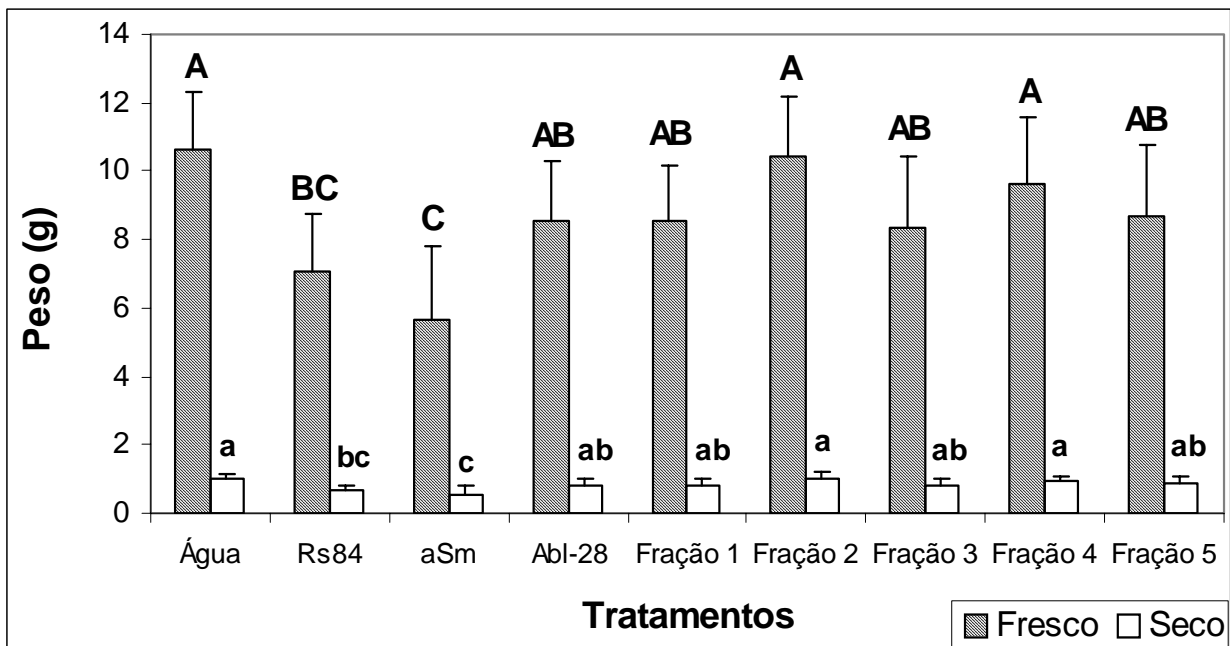


Figura 12 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (Abl-28) e suas frações obtidos através da cromatografia de troca aniônica (CTA), sobre o desenvolvimento das plantas de berinjela. Avaliação efetuada com base no peso fresco e seco. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco

2.2.3.7 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas

O gel de poliacrilamida com as amostras das frações da CTA de Abl-28, bem como seu precipitado 60-80% (p60-80), nos mostra a presença de uma proteína de aproximadamente 29 kDa, tanto na fração 4 como na amostra da precipitação 60-80% de Abl-28 (Figura 13).

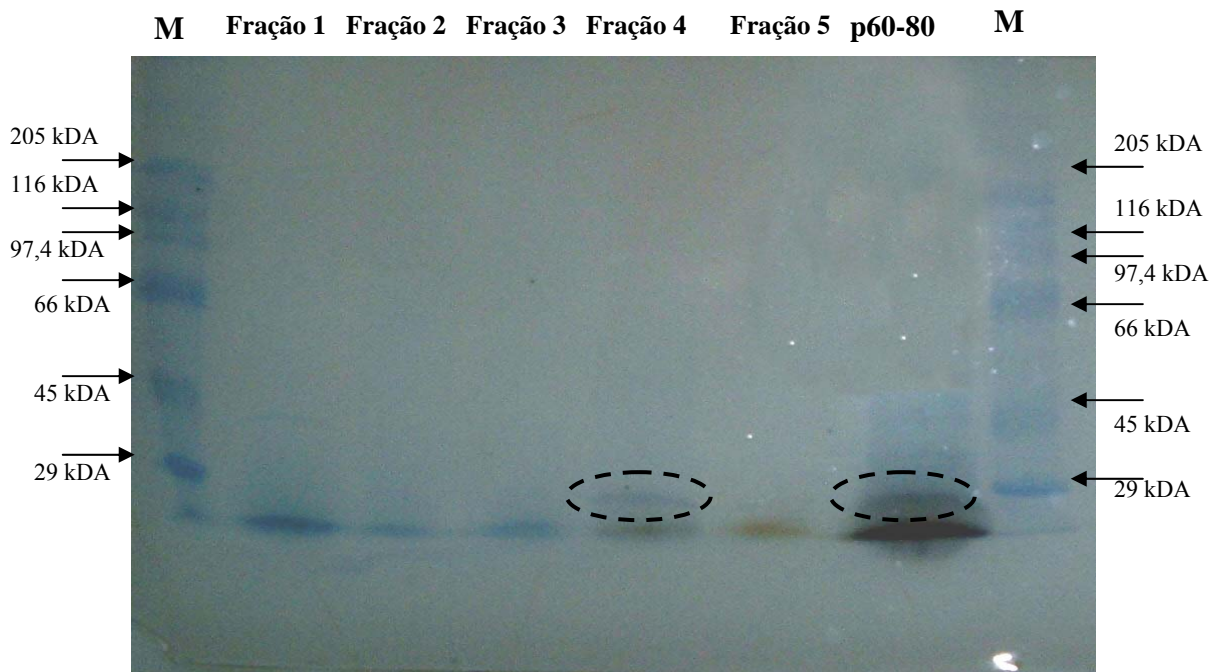


Figura 13 – Separação eletroforética em gel de poliacrilamida das frações 1 a 5 da Cromatografia de troca aniônica e do precipitado 60-80% do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (Abl-28). Foi padronizada a quantidade de proteína aplicada no gel em 40 µg. M = marcador molecular de 29 a 205 kDa (SDS-200 Sigma®)

2.2.4 Discussão

Apesar das preparações dos isolados Abl-28 10% e Abl-11, 5% e 20% exercerem pequeno efeito inibitório sobre o crescimento de *R. solanacearum* em um dos testes *in vitro*, os demais tratamentos não diminuíram e alguns deles até estimularam o crescimento da bactéria. Este mesmo resultado foi obtido por Di Piero e Pascholati (2004), onde os isolados Le95/01 e Le96/22 de *L. edodes* não apresentaram efeito direto sobre a bactéria *Xanthomonas vesicatoria* e, outros isolados de *A. blazei* chegaram a estimular o crescimento bacteriano no teste *in vitro*. Entretanto, efeito diferente foi obtido por Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Junior (1999), que utilizaram um isolado de *L. edodes* e obtiveram inibição do crescimento *in vitro* de diversas bactérias, inclusive de *Ralstonia solanacearum*. Outros compostos, como extrato cítrico, também já foram testados *in vitro* contra do crescimento de *R. solanacearum*, mostrando ter efeito na redução da concentração das células bacterianas (MOTOYAMA et al., 2003).

Interessante observar que, além do extrato aquoso do isolado Abl-28 de *A. blazei* exercer pequeno efeito inibitório sobre a bactéria em um dos testes *in vitro*, este mesmo extrato reduziu a murcha bacteriana nos experimentos de casa-de-vegetação, proporcionando uma menor ocorrência de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos. O tratamento com aSm também proporcionou menor ocorrência de folhas murchas.

O efeito protetor de Abl-28 e aSm, observado pela menor ocorrência de folhas murchas em berinjela, também foi observado em um trabalho semelhante, realizado por Di Piero e Pascholati (2004), no patossistema tomate / *Xanthomonas vesicatoria*. Neste trabalho, o extrato aquoso de Abl-28 e o aSm reduziram a severidade da bacteriose, obtendo-se uma proteção média de 45%. 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.

As análises bioquímicas realizadas a partir das folhas de berinjela coletadas mostraram que as quitinases não são marcadores de resistência adequados para o patossistema estudado, visto que até ocorreu uma diminuição da atividade nas plantas tratadas com os indutores e inoculadas com a bactéria. A mesma situação ocorreu na atividade de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, exceto para o tratamento Abl-11, onde ocorreu um aumento na atividade destas duas enzimas (Figura 7).

Esta inesperada redução na atividade de algumas enzimas também foi verificada por Osswald et al. (2004) 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.

No caso das peroxidases, o indutor aSm e o Abl-28 provocaram elevação de sua atividade aos 7 dias após o tratamento (5 dias após a inoculação com a bactéria), sendo mais eficiente que o fitopatógeno em induzir a atividade desta enzima. Além disso, as plantas tratadas com Abl-28 continuaram tendo maior atividade de peroxidase aos 12 dias após o tratamento, sendo que esta maior atividade enzimática no tratamento Abl-28 coincidiu com menor porcentagem de folhas murchas. Em relação ao tratamento com Abl-11, a maior atividade ocorreu apenas aos 12 dias após o tratamento. O aumento da atividade das peroxidases coincidiu com aumentos na quantidade de proteínas das plantas tratadas com o aSm e com Abl-28.

A peroxidase é uma importante enzima nas plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, defesa contra patógenos, entre outras (GASPAR et al., 1982 e KAO, 2003 apud CAMPOS et al., 2004).

Estudando o efeito da aplicação do isolado Pfl de *Pseudomonas fluorescens* em raízes de tomate, Ramamoorthy, Raguchander e Samiyappan (2002) verificaram que a atividade de peroxidase aumentou nas plantas tratadas com Pfl e posteriormente desafiadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tanto em casa-de-vegetação como no campo. A atividade máxima desta enzima foi observada no quarto dia após a inoculação com o patógeno, sendo que as plantas mantiveram alto nível de atividade por todo o período do experimento. As atividades de β -1,3-glucanase e quitinase também aumentaram e suas maiores atividades foram observadas de 3 a 5 dias após a inoculação com *F. oxysporum*. A atividade de peroxidase das plantas de berinjela foi semelhante a este trabalho, visto que as plantas tratadas com Abl-28 tiveram elevação nesta atividade aos 5 e 10 dias após a inoculação com a bactéria.

Avaliando o efeito de acibenzolar-S-metil na indução de resistência em três cultivares de feijoeiro, com diferentes níveis de resistência à murcha-de-Curtobacterium, Soares, Maringoni e Lima (2004) verificaram que o indutor foi ineficiente em controlar a doença na cultivar

suscetível e em incrementar os níveis de resistência nas cultivares resistentes. Entretanto, a atividade de peroxidase aumentou, tanto nas folhas como no caule das plantas.

A atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase, superóxido dismutase, poligalacturonase, pectina metilesterase e amilase foram estudadas em plantas de berinjela, contra patógenos de solo (KAWARADANI et al., 1994). Foi verificado que a atividade de β -1,3-glucanase e amilase aumentaram em relação às plantas saudas, na inoculação com *Verticillium dahliae*. A atividade de superóxido dismutase foi elevada na folhas de berinjela infectadas com *R. solanacearum*.

Continuando a investigar o efeito de Abl-28 na proteção das plantas de berinjela contra a murcha, realizou-se novo experimento através da aplicação do extrato aquoso de Abl-28, de suas frações da precipitação com sulfato de amônio e do indutor acibenzolar-S-metil. Foi possível observar uma menor ocorrência de folhas murchas no tratamento com o precipitado 60-80% de Abl-28. O extrato aquoso de Abl-28 e com acibenzolar-S-metil também continuaram protegendo as plantas de berinjela em relação ao tratamento Rs84.

Procurando estudar o efeito do precipitado 60-80% de Abl-28, realizou-se outro experimento com as frações da CTA obtidas do precipitado 60-80%. Foi possível observar que a fração 4 (a de maior concentração na CTA), bem como o extrato aquoso de Abl-28, promoveram a menor ocorrência de folhas murchas de berinjela, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Com relação ao peso fresco e peso seco, a fração 4 continuou sendo a melhor entre os tratamentos, juntamente com o tratamento Água, promovendo maior peso das plantas de berinjela. Essas frações da CTA foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante, visando observar o(s) elicitore(s) presente(s) no basidiocarpo de *A. blazei*. Observou-se que a fração 4 e o precipitado 60-80% possuem uma banda de aproximadamente 29 kDa.

Os elicitores são moléculas que estimulam respostas de defesa nas plantas, por desencadarem a transdução de sinais que levará a ativação dos mecanismos de defesa (HAHN, 1996). A purificação parcial de elicitores envolvidos na proteção de plantas, obtidos a partir de extratos de cogumelos, já foi estudada por Di Piero (2003). A aplicação do precipitado e das frações da CTA do isolado Le-96/22 permitiram ao autor verificar a redução na severidade da antracnose em plântulas de pepino, bem como a purificação parcial de elicitores de peroxidase em cotilédones de pepino. Outras frações, como as oriundas da cromatografia da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, foram testadas por Labanca (2002), induzindo resistência

local em pepino contra *Coletothichum lagenarium*, além de proporcionar reduções de 50% a 70% nas áreas lesionadas e aumentar a atividade de peroxidases.

Finalmente, com base no presente trabalho, novos estudos envolvendo as frações de interesse no controle de doenças em plantas poderão mostrar a viabilidade de se obter um produto comercial a partir do cogumelo *Agaricus blazei*.

2.3 Considerações Finais

O extrato aquoso de basidiocarpos do isolado Abl-28 de *Agaricus blazei* demonstrou potencial para diminuir a murcha bacteriana em berinjela, causada por *Ralstonia solanacearum*. Além disso, por não ter ação direta sobre o patógeno *in vitro* e por ter alterado a atividade da enzima peroxidase, sugere-se que o mesmo induziu resistência nas plantas de berinjela. Comportamento semelhante foi apresentado pelo indutor acibenzolar-S-metil, que também reduziu a murcha bacteriana e aumentou a atividade de peroxidase.

A precipitação com sulfato de amônio o extrato aquoso de Abl-28, seguida pela cromatografia de troca aniônica do precipitado 60-80% permitiram verificar a presença de uma banda de aproximadamente 29 kDa, em gel de poliacrilamida desnaturante. Obteve-se assim uma purificação parcial do elicitador presente nos basidiocarpos de *A. blazei*.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952 p.

AKIEW, E.B.; TREVORROW, P.R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994. p. 179-198.

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. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2003. v. 11, p. 107-131.

ARAÚJO, J.S.P.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte 2. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2004. v. 12, p. 145-200.

BIANCO COLETTI, M.A. Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. **Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunologia**, [s.l.], v. 75, p. 267-274, 1981.

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**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 197 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

COOK, D.; SEQUEIRA, J. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994. p.77-93.

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

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.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 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**, New York, v. 7, p. 281-299, 2005.

FERREIRA, L.P.; SALGADO, C.L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v.1: Princípios e conceitos, p. 97-130.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Hortifrutícolas. In: _____. **Agrianual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 336-338.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. 78 p.

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.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

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. 1-6, 2001.

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

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.

ISHIKAWA, N.K. **Atividade antibacteriana em *Lentinula edodes***. 1998. 33 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

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.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 39, p. 153-184, 1993.

KAWARADANI, M.; KUSAKARI, S.; MORITA, S.; TANAKA, Y. The enzyme activities in eggplant infected with the soilborne diseases and application to diagnosis for diseases. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 60, n. 4, p. 507-513, 1994.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Lancaster, v. 44, p. 693-695, 1954.

KRAMER, N.; AMARAL, J.F. A identificação da murcha bacteriana presente em cultura de batatinha no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 199-207, 1944.

KUROZAWA, C.; SAKAMOTO, H.S.; KOYAMA, G.S. Controle químico de bacterioses do alho. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v. 24. p. 82-83, 1998.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. – São Paulo: Ceres, 2005. v.2: Doenças das plantas cultivadas, p.607-626.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum Iagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LI, H.P.; GOTH, R.W.; BARKSDALE, T.H. Evaluation of resistance to bacterial wilt in eggplant. **Plant disease**, St. Paul, v. 72, p. 437-439, 1988.

LOPES, C.A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: LOPES, C.A.; ESPINOSA, N. (Ed.). **Memorias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1994. p. 17-22.

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.

MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J.M. Controle químico da mancha bacteriana. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 12, p. 92-101, 1986.

MORGADO, H.S.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Métodos para avaliação de resistência à murcha bacteriana em berinjela. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 237-245, 1994.

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.

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.

OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININN, 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.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA JUNIOR, R.O. Shiitake mycelial leachate supresses 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.

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 141-199.

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.

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. 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 1, p. 55–68, 2002.

SOARES, R.M., MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 373-377, 2004.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Medicinais. **Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento**, Brasília, n. 11, p. 16-24, 1999.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 170-177, 1997.

TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citros** : potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

UMESHA, 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.

VON PARSEVAL, M. Uma doença do fumo e batata inglesa no município de Santa Cruz, R.S., causada pelo *Bacterium solanacearum*. **Boletim do Instituto Borges de Medeiros**, Porto Alegre, v. 1, p. 13, 1922.

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.

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, p. 197-205, 1990.

3 AÇÃO INDUTORA DE RESISTÊNCIA DE *Lentinula edodes* E *Agaricus blazei* EM TOMATEIRO CONTRA *Ralstonia solanacearum* E *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Resumo

Dentre as diversas doenças que afetam a cultura do tomateiro, as de etiologia bacteriana, como *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* têm causado grandes prejuízos. Devido às dificuldades de controle, novas alternativas têm sido procuradas, sendo a indução de resistência um método potencial de controle, podendo ser ativado por indutores bióticos ou abióticos. Entre estes indutores, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, que já têm sido amplamente pesquisados na área médica, têm sido utilizados em pesquisas para o controle de doenças em plantas. Com o objetivo de estudar o efeito dos extratos aquosos destes cogumelos e do indutor acibenzolar-S-metil (aSm) no controle da murcha e do cancro bacteriano em tomateiro, observando seu modo de ação através de alterações na atividade de determinadas enzimas e na obtenção de moléculas de interesse agrônomo é que o presente trabalho foi realizado. Inicialmente, verificou-se que os isolados de *A. blazei* e *L. edodes*, utilizados em diversas diluições, bem como o aSm, não exerceram nenhum efeito inibitório *in vitro* no crescimento das bactérias. Porém, os isolados Abl-26 de *A. blazei* e Le-96/17 de *L. edodes* reduziram significativamente a ocorrência de folhas murchas das plantas de tomate, em casa-de-vegetação, quando aplicados a 10% (v/v), dois dias antes da inoculação das plantas com os patógenos. O aSm também reduziu significativamente a ocorrência de folhas murchas. No estudo de possíveis alterações na atividade enzimática, no patossistema tomate/*Ralstonia*, a atividade de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não foi alterada nas plantas, exceto a atividade de quitinase no tratamento aSm, que aumentou no 3º e 7º dias após o tratamento. Na atividade da peroxidase, os tratamentos aSm, Abl-26 e Le-96/17 ocasionaram aumentos na atividade no 7º, 12º e 3º dia após o tratamento, respectivamente. No patossistema tomate/*Clavibacter*, a atividade de peroxidase e quitinase aumentou no 17º dia após o tratamento em todos os tratamentos indutores em relação às plantas tratadas com água. Somente aSm ocasionou aumento na atividade de peroxidase também no 7º dia após o tratamento. Já a atividade de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase aumentou, em resposta a todos os tratamentos, em relação às plantas tratadas com água, no 4º dia após o tratamento. Além disso, plantas tratadas com aSm e Le-96/17 exibiram aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase no 7º e 12º dias após o tratamento, e na atividade de polifenoloxidase no 7º, 12º, 17º e 22º dias após o tratamento. O isolado Le-96/17 apresentou os melhores resultados e seu extrato aquoso bruto foi fracionado com sulfato de amônio, sendo posteriormente submetido o precipitado 40-80% à cromatografia de troca aniônica (CTA). Após a CTA, seis frações protéicas foram obtidas e as frações 3 e 4, junto com aSm e o extrato aquoso de Le-96/17 reduziram a ocorrência de folhas murchas no patossistema tomate/*Clavibacter*. No patossistema tomate/*Ralstonia*, a fração 3, o aSm e o extrato aquoso de Le-96/17 reduziram a ocorrência de folhas murchas. A separação eletroforética destas frações da CTA, do precipitado 40-80% e extrato aquoso de Le-96/17 revelaram a presença de mais de uma banda no gel na fração 3 e 4 da CTA. Com base nos resultados, sugere-se que o isolado Le-96/17 de *L. edodes* induziu resistência em tomateiro contra *R. solanacearum* e *C. michiganensis*, obtendo-se uma purificação parcial dos elicitores presentes nos basidiocarpos de *L. edodes*.

Palavras-chave: Murcha bacteriana; Cancro bacteriano; Resistência sistêmica adquirida

Abstract

Among the diseases that affect tomato plants, bacterial diseases like *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, cause high losses. Because the difficulties to control these diseases, new alternatives must be searched, being the induced resistance a potential method for the alternative control, by using biotic or abiotic elicitors. Among these inducers, the mushrooms *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei*, used in medical research and exhibits the potencial to be used in research for the control of plant diseases. The objectives of the present work were evaluate the potential of these mushrooms and acibenzolar-S-metil (aSm) in controlling bacterial wilt and canker in tomato plants, study mode of action of these materials based upon the activity of some enzymes and, partially purify biologically active molecules. Initially, it was shown that the aqueous extracts from the isolates and dilutions of *A. blazei* and *L. edodes*, as well as aSm, did not inhibit *in vitro* bacterial growth. However, the isolates Abl-26 of *A. blazei* and Le-96/17 of *L. edodes* reduced the wilt in tomato plants under greenhouse conditions, when the mushrooms extracts at 10% (v/v) were applied two days before plant inoculation. The aSm also reduced wilt. Regarding enzyme activity in the tomato/*Ralstonia* interaction, the chitinase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities did not change, except the chitinase activity for the treatment aSm, which increased in the 3^o and 7^o days after the treatment. Plants treated with aSm, Abl-26 and Le-96/17 exhibited increasing peroxidase activity 7, 12 and 3 days after the treatments, respectively. In the tomato/*Clavibacter* interactions, plants treated with aSm, Abl-26 and Le-96/17 exhibited increases in peroxidase and chitinase activities 17 days after the treatment. The aSm caused increased peroxidase activity also 7 days after the treatment. The phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase activities increased in the 4^o day after treatment, for all the treatments in relation to the plant treated with water. Moreover, plants treated with aSm and Le-96/17 exhibited increased phenylalanine ammonia-lyase activity in the 7^o and 12^o days after the treatment, and polyphenoloxidase activity in the 7^o, 12^o, 17^o and 22^o days after the treatment. Since the isolate Le-96/17 was the best one in reducing the wilt, its aqueous extract was fractionated with ammonium sulphate. The fraction (precipitated from 40-80%) was submitted to anion exchange chromatography (AEC) and the fractions 3 and 4 from AEC, aSm and the aqueous extract of Le-96/17 were shown to reduce bacterial disease in the tomato/*Clavibacter* interaction. For the tomato/*Ralstonia* interaction, fraction 3, aSm and the aqueous extract from Le-96/17 reduce bacterial wilt. Fractions 3 and 4, the precipitated 40-80% and the aqueous extract from Le-96/17 showed more than one protein band under electrophoresis. Based upon these results, it is suggested that the isolate Le-96/17 of *L. edodes* induced resistance in tomato plants against *R. solanacearum* and *C. michiganensis* and a partial purification of the inducer molecules present in the *L. edodes* fruiting body was obtained.

Keywords: Bacterial wilt; Bacterial canker; Acquired systemic resistance

3.1 Introdução

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma hortaliça amplamente cultivada no mundo, tendo como consequência de sua expansão o aumento dos problemas fitossanitários. É uma espécie originária das Américas, onde foi cultivada e melhorada, sendo introduzida na Europa entre 1523 e 1554 (FILGUEIRA, 2000; MAFFIA; MARTINS; MATSUOKA, 1980).

No Brasil, o tomateiro foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX, tornando-se a segunda hortaliça em importância. É cultivado comercialmente na maioria dos estados brasileiros, estando presente em todas as regiões do país. A região Sudeste é a maior produtora, atingindo em média 1,7 milhões de toneladas/ano, nos últimos quatro anos. (FNP, 2006).

O tomateiro é uma planta que apresenta dois hábitos de crescimento distintos, sendo que estes hábitos interferem no manejo e na ocorrência de pragas e doenças. O tomate com hábito indeterminado é aquele conduzido de forma tutorada, produzindo frutos para mesa. O de hábito determinado produz frutos com finalidade agroindustrial, sendo a cultura rasteira (FILGUEIRA, 2000).

Dentre as diversas doenças que afetam a cultura do tomateiro, as de etiologia bacteriana têm causado grandes prejuízos, uma vez que seu controle é difícil. Dentre elas, a murcha causada por *Ralstonia solanacearum* tem promovido elevadas perdas 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).

Outra bactéria, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis, agente causal do cancro bacteriano em plantas de pimentão e tomate, tem importância relevante para o tomateiro estaqueado, podendo destruir grande parte da plantação. A doença tem causado consideráveis perdas em todo o mundo e seu agente pode sobreviver em sementes, no solo e em hospedeiros secundários (AGRIOS, 2005; DIAS; TAKATSU, 1989; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A medida de controle mais efetiva é o uso de variedades resistentes, obtidas via incorporação de resistência genética aos patógenos (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1994). Entretanto, medidas preventivas para o controle destas bactérias são necessárias, uma vez que não existem produtos químicos que controlem eficientemente estas doenças. Entre as medidas

preventivas, deve-se evitar o plantio em locais anteriormente cultivados com tomateiro ou outras solanáceas e remover e destruir as plantas infectadas, para o controle de ambas as doenças. Para *C. michiganensis*, deve-se ainda realizar rotação de culturas por um período mínimo de 3 anos, tratamento de equipamentos com hipoclorito de sódio, tratamento de sementes com água quente (56°C/30min) ou utilizar sementes certificadas (AGRIOS, 2005; CHANG; RIES; PATAKY, 1991; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997;).

Devido à dificuldade para o controle destas doenças, deve-se buscar novas alternativas de controle, sendo a indução de resistência um método potencial para promover a redução da severidade de doenças em diversas culturas. Esta indução pode ser efetiva contra diversos patógenos, incluindo viroses, bactérias e fungos, podendo ser ativada por indutores bióticos ou abióticos (BAYSAL; SOYLU; SOYLU, 2003; BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 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 potencial (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002). Experimentalmente, vários microrganismos têm mostrado potencial para induzir resistência contra doenças em tomateiro. Anfoka e Buchenauer (1997) relataram a indução de resistência local e sistêmica em plantas de tomateiro contra *Phytophthora infestans* por meio da inoculação prévia com *Tobacco necrosis virus* (TNV), enquanto o fungo formador de micorriza arbuscular, *Glomus mosseae*, induziu resistência sistêmica contra *Phytophthora parasitica* (CORDIER et al., 1998).

Entre os diversos indutores existentes, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, que já têm sido amplamente pesquisados na área médica, estão sendo também pesquisados como agentes indutores de resistência, para o controle de doenças em plantas (EIRA et al., 2005). Os resultados obtidos por Piccinin (2000) demonstraram que a lentinana, uma substância obtida a partir do extrato aquoso do corpo de frutificação de *L. edodes*, não apresentou atividade direta contra *Exseroillum turcicum*, *C. sublineolum* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em testes realizados *in vitro*, no entanto, protegeu plantas de sorgo contra ambos os fungos e plantas de maracujá contra a bactéria, pela ativação das defesas das plantas.

Em razão da importância da murcha e do cancro para a cultura do tomateiro e do efeito potencial de extratos de *L. edodes* e *A. blazei* sobre a indução de resistência em outras plantas, o presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar o potencial indutor de resistência de extratos aquosos destes basidiomicetos em tomateiro contra as bactérias causadoras de murcha e cancro;
- Investigar os possíveis mecanismos bioquímicos ativados nas plantas, bem como procurar identificar o(s) princípio(s) ativo(s) existente(s) nos extratos que exercerem efeito indutor.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

Dentre os agentes causadores de doenças de expressão econômica na agricultura brasileira, as bactérias vêm assumindo importância crescente, provocando elevadas perdas, embora não existam estatísticas precisas. O aumento da importância das bactérias como fitopatógenos têm sido atribuída ao desequilíbrio progressivo do agroecossistema, emprego de cultivares de alto potencial produtivo, porém suscetíveis, resistência das fitobactérias a princípios tóxicos comumente empregados na lavoura, além da própria competência das fitobactérias por sobreviverem de forma variada, de se disseminar eficazmente e de multiplicar o inóculo com rapidez (ARAÚJO et al., 2003; GARTEMANN et al., 2003; KIMATI et al., 1997; KIMURA; CARMO, 1995; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; ROMEIRO, 1995).

Na cultura do tomateiro, as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum* representam importantes patógenos, pelas perdas que causam à cultura. *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria gram negativa, aeróbica, bastonetiforme (0,5 – 0,7 a 1,5 – 2,5 µm) com um tufo de flagelos polares, pertencente ao grupo não fluorescente da família *Pseudomonadaceae* (PALLERONI, 1984). Esta bactéria tem sido classificada de acordo com a hospedeira, distribuição geográfica, patogenicidade, relações epidemiológicas, propriedades fisiológicas e padrões de proteínas de membranas (DRISTIG; DIANESE, 1991; HAYWARD, 1991). Assim, foram relatadas 5 raças baseadas principalmente na gama de hospedeiras que afetam (AGRIOS, 2005). A raça 1 (biovars 1, 3 e 4) ataca um grande número de plantas, incluindo batata, tomate, fumo e solanáceas em geral. A raça 2 (biovars 1, 3 e 4) ataca banana e similares. A raça 3 (biovar 2) é considerada específica de batata, mas está associada a algumas solanáceas. A raça 4 (biovar 4) ataca gengibre e a raça 5 amora (HAYWARD, 1994; HAYWARD, 1991). 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).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* é uma bactéria Gram-positiva, que tem causado grandes prejuízos no cultivo de tomate (GARTEMANN et al., 2003). A planta é suscetível à bactéria em qualquer idade e todos os órgãos da planta podem ser afetados. A bactéria se caracteriza por apresentar dois tipos de colonização no tomateiro, ou seja, localizada e sistêmica. A colonização localizada é mais comum nas épocas chuvosas, porque favorece a disseminação e penetração da bactéria nos tecidos das plantas, via estômatos e hidatódios. Já a colonização sistêmica é a mais importante porque as plantas afetadas murcham parcial ou totalmente, pela penetração da bactéria por aberturas naturais e ferimentos, sobretudo pelas raízes. Neste caso, ocorre uma rápida multiplicação da bactéria e colonização do sistema vascular de modo ascendente (KUROZAWA, 1984; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A resistência do hospedeiro a um patógeno pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. A planta pode dispor de mecanismos para resistir ao ataque dos patógenos, quer seja por respostas pré-formadas ou de defesa induzida (HEATH, 2000). Esta defesa induzida ou resistência induzida ocorre devido ao aumento da resistência da planta por meio da utilização de agentes externos (indutores), sem que haja qualquer alteração no genoma da planta (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; STADNIK, 2000).

Trabalhando com plantas de fumo, Averde e Kelman (1964) induziram resistência localizada nos tecidos vegetais pela co-inoculação de isolados virulentos e avirulentos de *Ralstonia solanacearum*, encontrando graus variáveis de resistência. Sequeira e Hill (1974), ao inocularem células mortas de *R. solanacearum*, conseguiram proteger tecidos de fumo contra isolados virulentos do próprio patógeno.

Um indutor de resistência pode estar ativando os mecanismos de defesa de uma planta por provocar, por exemplo, aumentos no acúmulo de fitoalexinas e/ou proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-RP), quando da chegada do patógeno. Desse modo, é que Zehnder et al. (1997) mostraram significativa redução na murcha causada por *Erwinia tracheiphila* em pepino, cujas sementes foram tratadas com uma suspensão de rizobactérias promotoras de crescimento (RPC), organismos capazes de provocarem o acúmulo de fitoalexinas nas plantas.

A ativação dos mecanismos de defesa da planta pode ser obtida pelo tratamento com agentes abióticos, como o ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997) ou o acibenzolar-S-metil (aSm), derivado benzotiadiazólico capaz de atuar como análogo funcional do ácido salicílico, que é uma molécula endógena sinalizadora de reações de defesa das plantas. Estas defesas podem estar relacionadas com barreiras bioquímicas e estruturais de plantas geneticamente suscetíveis, possibilitando uma proteção de campo contra um amplo espectro de doenças em diversas espécies cultivadas (GORLACH et al., 1996; LOUWS; WILSON; CAMPBELL, 2001). Os agentes bióticos, sejam estes microrganismos viáveis ou inativados, podem também ativar os mecanismos de defesa da planta (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994).

Dentre os agentes bióticos, os cogumelos têm grande potencial na produção de metabólitos bioativos, sendo estes utilizados na medicina como fonte para novos componentes farmacológicos com propriedades antimicrobianas, antivirais, antitumor, antialérgica, antiinflamatória, entre outras (EIRA et al., 2005; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005). Além de pesquisas na área médica, os cogumelos também têm sido utilizados na área agrônômica contra diversos fitopatógenos. Di Piero (2003) investigou o potencial de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* no controle de doenças em pepino, maracujá e tomate, verificando que estes cogumelos possuem substâncias elicitoras de respostas de defesa nas plantas, podendo auxiliar no controle de fitopatógenos.

O cogumelo *Lentinula edodes*, conhecido como “shiitake”, é um basidiomiceto cujo corpo de frutificação é amplamente utilizado na culinária asiática e seu consumo vem sendo difundido atualmente ao nível mundial, incluindo o Brasil, sendo o segundo cogumelo comestível mais popular no mercado global (PRZYBYŁOWICZ; DOMOGHUE, 1990; SUGUI et al., 2003). O cogumelo tem atraído a atenção de pesquisadores por apresentar qualidades nutricionais, medicinais e terapêuticas comprovadas cientificamente. Estão presentes nessa espécie substâncias de ação antitrombótica, hipocolesterolêmica e imunopotenciadora (MAKI, 1999). Uma heteroglucanoproteína, composta de galactose, xilose, arabinose, vitaminas do complexo B, ergosterol, conhecida como LEM (“*L. edodes* mycelia”), pode ser obtida a partir dos extratos do micélio do cogumelo ou ainda da cultura líquida do crescimento micelial (SUGANO et al., 1982). Alguns dos compostos de LEM modulam respostas imunológicas em animais, por ativação de macrófagos, enquanto outros apresentam caráter antibiótico.

O cogumelo *A. blazei* é uma espécie nativa do Brasil, que apresenta propriedades medicinais e inúmeros princípios ativos, os quais vêm atraindo a atenção da comunidade médico-científica e do público em geral. Anteriormente conhecido como *A. blazei* Murril, iniciou-se um trabalho de identificação deste cogumelo ao se enviar diversas excidatas de linhagens de *A. blazei* de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul para pesquisadores da Embrapa (EIRA et al., 2005). Posteriormente, a identificação destas linhagens foi concluída com base no trabalho de Wasser et al. (2002), os quais propuseram a nova espécie *Agaricus brasiliensis* (Murrill) ss. Wasser. Porém, foram realizados estudos comparativos entre várias espécies de *Agaricus*, indicando que *A. brasiliensis* (= *A. blazei* Murrill) é biológica e filogeneticamente identificada como *A. subrufescens* Peck, classificada em 1893, também nativa na América do Norte (KERIGAN, 2005). Porém, no decorrer deste trabalho será adotada a classificação *Agaricus blazei*.

Em relação à fitopatologia, Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Junior (1999) demonstraram que o lixiviado micelial de *L. edodes* impedia a murcha bacteriana do tomateiro provocada por *R. solanacearum* e a murcha de feijoeiro causada por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, quando aplicados em substrato composto por mistura de vermiculita e promix (1:1), previamente infestado com as bactérias. Di Piero (2003) verificou a proteção de plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria* 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, Yamamoto e Fujita (1995) observaram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e sobre fungos. Posteriormente, foi isolado o composto antibacteriano (contra bactérias Gram positivas) formado por um álcool β -fenetil e lentinamicin, que estava presente em culturas líquidas de micélio (KOMEMUSHI; YAMAMOTO; FUJITA, 1996). Ainda, o filtrado de pileo (FP) de *L. edodes* mostrou-se bacteriostático, enquanto que o filtrado do estipe (FE) e o filtrado de micélio (FCM) foram bactericidas para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, quando usados na forma de extrato aquoso (PICCININ, 2000). Filtrados de basidiocarpo de *A. blazei* mostraram resultados positivos quando aplicados em plantas de maracujá, provocando uma redução superior a 80% na incidência da virose causada por *Passionfruit woodness virus* – PWV (DI PIERO; PASCHOLATI, 2002).

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Obtenção dos isolados 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 cedidos pela Profª Dra. Marli T. A. Minhoni. Utilizaram-se nos bioensaios os isolados Le-96/22, Le-96/17 de *L. edodes*, obtidos de basidiocarpos produzidos em toras de eucalipto, e os isolados Abl-26 e Abl-29 de *A. blazei*, obtidos de cultivo axênico.

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

Para obtenção do extrato aquoso, o pó seco de basidiocarpos, de cada um dos isolados de cogumelo testados, recebeu 14 mL de água destilada por grama e, após 24 h de incubação a 4°C, a suspensão foi filtrada em papel filtro comum e centrifugada a 20.000g por 25 min. Para os bioensaios realizados em casa-de-vegetação, os extratos aquosos foram diluídos. Assim, o extrato aquoso a 10% v/v (10 mL de extrato bruto + 90 mL de água destilada) continha o equivalente a 7,15 mg de pó seco de basidiocarpo/mL. Para os testes realizados *in vitro*, os extratos aquosos foram filtrados em membrana tipo Millipore (diâmetro do poro = 0,2 µm), sob condições assépticas, sendo posteriormente armazenados em geladeira até serem usados.

3.2.2.3 Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e das plantas

Os isolados utilizados nos ensaios da cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) foram *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (To534) e *Ralstonia solanacearum* (Rs47), obtidos junto à empresa de sementes Sakata Seed Sudamerica Ltda, de Bragança Paulista, com o Engenheiro Agrônomo Dr. Ricardo Gioria. Para a realização dos ensaios, o isolado To534 foi cultivado em meio de cultura nutriente-ágar (NA), composto por extrato de carne (3 g); peptona (5g); agar (15g); água destilada para completar 1 litro. O isolado Rs47 foi cultivado no meio NA e no meio de tetrazólio (KELMAN, 1954), cuja composição apresenta glicerol (5,0 mL), peptona (10 g), caseína (1 g), ágar (18 g), cloreto de tetrazólio 1% (5,0 mL), água destilada para completar 1 litro e pH 6,8-7,0, ajustado com NaOH.

Para a preservação dos isolados bacterianos, foram utilizados tubos de ensaio contendo o meio NA cobertos por óleo mineral esterilizado e frascos com água destilada esterilizada

(WAKIMOTO et al., 1982). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados a temperatura ambiente ou na geladeira.

Em todos os bioensaios, buscou-se a uniformidade das plantas de tomate, utilizando o Hib. F1 Carmen, cujas sementes foram cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda, através do Engenheiro Agrônomo Msc. Robert Wierzbicki. 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.

3.2.2.4 Obtenção do inóculo bacteriano

Os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio NA, sendo incubados no escuro por 48 h a $28\pm 2^\circ\text{C}$. Após o crescimento das colônias, foram preparadas as suspensões bacterianas em água destilada, ajustando-se a concentração para 10^8 ufc/mL, em espectrofotômetro (0,1 de absorbância a um comprimento de onda de 550 nm).

3.2.2.5 Efeito *in vitro* dos cogumelos sobre *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *R. solanacearum*

Tubos de ensaio contendo 7 mL de água destilada esterilizada receberam extratos brutos dos isolados de *L. edodes* (Le-96/17 e Le-96/22) e *A. blazei* (Abl-26 e Abl-29), obtendo-se concentrações finais que variaram de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). O tratamento controle foi representado por tubos contendo somente água. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de uma suspensão bacteriana de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ou de *R. solanacearum* em cada tubo, de modo que a concentração final em cada tubo fosse de 10^8 ufc/mL. O volume final de cada tubo foi de 10 mL, com cinco repetições por tratamento, onde cada tubo representou uma repetição.

Os tubos contendo os extratos com as suspensões bacterianas foram mantidos no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Ao final deste período, alíquotas de 300 μL de cada tubo foram pipetadas em placas de Petri contendo o meio NA, onde foram espalhadas por toda a superfície do meio, com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram novamente mantidas no escuro a $28\pm 2^\circ\text{C}$, por 48 h. A avaliação dos resultados foi efetuada com uso de um espectrofotômetro. Para isto, 20 mL de água destilada foram colocados em cada placa, sendo feita a leitura da concentração da

suspensão bacteriana a 550 nm, obtendo-se como resultado o valor da unidade de absorvância (U.A.) por mL. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.2.6 Proteção de plantas em casa-de-vegetação

Sementes de tomate Hib. F1 Carmen foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato agrícola Plantmax® (Eucatex), e mantidas em casa-de-vegetação até sua utilização.

Nos bioensaios visando verificar a proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum* (Rs47), os tratamentos foram realizados dois dias antes da inoculação com a bactéria, quando as plantas apresentavam um par de folhas definitivas totalmente expandidas, através da rega do substrato com os extratos aquosos dos cogumelos (10 mL/planta) em cada célula da bandeja. A inoculação foi realizada no momento do transplante, através do corte das raízes com tesoura e posterior imersão em suspensão bacteriana calibrada para 10^8 ufc/mL (LOPES, 1981). As plantas foram transplantadas para vasos contendo substrato esterilizado composto de solo, esterco de curral e areia, e mantidas em casa-de-vegetação.

Em outro bioensaio, os extratos aquosos dos isolados de *L. edodes* e *A. blazei* foram aspergidos nas plantas de tomate com 5-6 folhas (10 mL/planta) e, após intervalo de tempo de dois dias, as plantas foram inoculadas por aspersão com a suspensão de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (10^8 ufc/mL), sendo mantidas em câmara úmida 24 h antes e 48 h depois da inoculação, em casa-de-vegetação (KRONKA, 2004).

Foram realizadas 10 repetições/tratamento, onde cada planta representou uma repetição, em um delineamento experimental completamente casualizado. Foram avaliadas a porcentagem de folhas murchas, o peso fresco, o peso seco e, para as plantas de tomate inoculadas com *C. michiganensis*, também foi avaliado o peso dos frutos. As plantas inoculadas com *R. solanacearum* foram avaliadas aos 5 e 10 dias após a inoculação. Já as plantas inoculadas com *C. michiganensis* foram avaliadas a cada cinco dias após a inoculação. Como controles, foram usadas plantas testemunhas inoculadas ou não com as bactérias. Os tratamentos realizados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm) e com os isolados dos cogumelos *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), utilizados no experimento em casa-de-vegetação. As plantas de tomate foram inoculadas com *R. solanacearum* (Rs47) ou com *C. michiganensis* dois dias depois de tratadas

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs47 ou To534
T3	aSm	0,05 g/L	Rs47 ou To534
T4	Abl-29	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T5	Abl-29	20% (v/v)	Rs47 ou To534
T6	Abl-26	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T7	Abl-26	20% (v/v)	Rs47 ou To534
T8	Le-96/17	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T9	Le-96/17	20% (v/v)	Rs47 ou To534
T10	Le-96/22	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T11	Le-96/22	20% (v/v)	Rs47 ou To534

3.2.2.7 Obtenção dos extratos proteicos

Os extratos dos cogumelos que promoveram os melhores resultados no controle das bactérias foram utilizados em novo bioensaio, a fim de se determinar possíveis alterações nas atividades de enzimas. Os procedimentos para obtenção de plantas, de inóculo e os métodos de inoculação foram idênticos àqueles descritos no item 3.2.2.6. Para as plantas de tomate inoculadas com *R. solanacearum*, as amostragens foram feitas aos 0, 1, 2, 3, 4, 7 e 12 dias após os tratamentos. No caso de *C. michiganensis*, as amostragens foram feitas aos 0, 2, 4, 7, 12, 17 e 22 dias após os tratamentos. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, onde cada planta representou uma repetição.

Os tratamentos realizados, tanto no bioensaio com *R. solanacearum* como com *C. michiganensis*, são descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm) e com os isolados dos cogumelos *Agaricus blazei* (Abl-26) e *Lentinula edodes* (Le-96/17), utilizados no experimento em casa-de-vegetação, envolvendo a atividade de enzimas. As plantas de tomate foram tratadas com água ou inoculadas com *R. solanacearum* (Rs47) ou com *C. michiganensis* dois dias depois de tratadas

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs47 ou To534
T3	aSm	0,05 g/L	Água
T4	aSm	0,05 g/L	Rs47 ou To534
T5	Abl-26	10% (v/v)	Água
T6	Abl-26	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T7	Le-96/17	10% (v/v)	Água
T8	Le-96/17	10% (v/v)	Rs47 ou To534

As amostras coletadas de plantas de tomate inoculadas com *R. solanacearum* consistiram de todas as folhas de cada planta. Nas plantas inoculadas com *C. michiganensis*, as amostras vegetais coletadas consistiram de todas as folhas de cada planta até a terceira coleta e, nas demais coletas, de 20 folhas do terço inferior das plantas. Estas amostras foram pesadas, mantidas no gelo e, posteriormente, armazenadas em congelador a -20°C , até o momento da extração. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em 4 mL de tampão de extração (tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0) com o auxílio de um almofariz, sendo 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 atividades de quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase.

3.2.2.8 Dosagem de proteínas totais

O conteúdo total de proteínas das amostras foi determinado através do método de Bradford (1976). Em 800 μL de sobrenadante, obtidos como descrito acima, adicionou-se 200 μL de reagente concentrado de Bradford, sendo que após 10 min realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em μg equivalentes de albumina de soro bovino (ASB) em 800 μL de amostra, foi determinada utilizando-se uma curva padrão de ASB que variou de 0 a 25 $\mu\text{g}\cdot 0,8\text{ mL}^{-1}$.

3.2.2.9 Atividade de peroxidase

A atividade da 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). 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.).

3.2.2.10 Atividade de quitinase

Para avaliar a atividade de quitinase utilizou-se a metodologia descrita por Wirth e 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, utilizando uma cubeta de referência com 800 μ L de tampão de extração + 200 μ L do substrato CM-Chitin-RBV + 200 μ L de HCl 1,0 M. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância/ min / mg de proteína/ (U.A. / min / mg prot).

3.2.2.11 Atividade de polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PPO) foi determinada de acordo com Duangmal e 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 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min, a cada 10 s. 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.

3.2.2.12 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha 100 µL do extrato protéico misturado com 400 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e com 500 µL 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 absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (o controle correspondia a uma mistura contendo 100 µL do extrato proteico + 900 µL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico / min / mg de proteína, utilizando uma curva padrão para o ácido.

3.2.2.13 Separação através de precipitação dos componentes das preparações com atividade biológica

O extrato aquoso de *L. edodes* (Le-96/17) proporcionou a melhor proteção das plantas nos patossistemas tomate/*Ralstonia* e tomate/*Clavibacter*, e foi submetido a procedimentos para a separação das proteínas presentes, através da precipitação com sulfato de amônio. A precipitação foi realizada utilizando 100 mL de filtrado bruto do extrato em saturações de 0-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%. Para se evitar a desnaturação das proteínas, o sal foi dissolvido gradativamente, com a suspensão mantida a temperatura de 10°C. Após a dissolução total do sal, os filtrados permaneceram em repouso durante 1 h a 10°C, sendo posteriormente centrifugados a 5.000g/35 min. Cada precipitado foi resuspenso em 4 mL de água destilada, dialisados contra água destilada e tiveram seu volume final ajustado com água destilada para 10 mL. As amostras dialisadas foram utilizadas em bioensaio.

3.2.2.14 Bioensaio com os componentes da precipitação com sulfato de amônio

Assim como nos bioensaios anteriores, as plantas de tomate foram tratadas na bandeja dois dias antes da inoculação com *R. solanacearum*, quando estas apresentavam um par de folhas definitivas totalmente expandidas, através da rega com água, acibenzolar-S-metil (0,05 g/L), extrato aquoso bruto de Le-96/17 (10 mL/planta), bem como com suas frações originárias da precipitação (1 mL/planta) em cada célula da bandeja. A inoculação foi realizada conforme

descrito no item 3.2.2.6, e as plantas foram transplantadas para vasos contendo substrato esterilizado composto de solo, esterco de curral e areia, e mantidas em casa-de-vegetação.

Foram realizadas 10 repetições/tratamento, onde cada planta representou uma repetição, em delineamento experimental completamente casualizado, sendo avaliadas a porcentagem de folhas murchas, o peso fresco e o peso seco das plantas. As avaliações foram efetuadas aos 5 e 10 dias após a inoculação. Os tratamentos realizados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm), com extrato aquoso do cogumelo *Lentinula edodes* (Le-96/17) e suas frações obtidas através da precipitação em sulfato de amônio. As plantas de tomate foram tratadas com água ou inoculadas com *R. solanacearum* (Rs47) dois dias depois de tratadas

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs47
T3	aSm	0,05 g/L	Rs47
T4	Le-96/17	10% (v/v)	Rs47
T5	Le-96/17 fração 0-40	-	Rs47
T6	Le-96/17 fração 40-60	-	Rs47
T7	Le-96/17 fração 60-80	-	Rs47
T8	Le-96/17 fração 80-100	-	Rs47

3.2.2.15 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica

O material com atividade biológica capaz de reduzir a murcha bacteriana em tomateiro, obtido através da precipitação com sulfato de amônio, foi submetido à cromatografia de troca aniônica (CTA), utilizando-se coluna de vidro preenchida com resina de troca iônica DietilaminoetilCelulose (DEAE-Celulose; Sigma). Todo material submetido à cromatografia foi filtrado em filtro tipo Milipore (diâmetro do poro = 0,2 µm) e degaseificado com auxílio de bomba de vácuo por 20 min. Para tanto, uma amostra de 4,5 ml do precipitado 40-80% de Le-96/17 foi aplicada no leito da coluna e eluída com tampão fosfato 25 mM (pH 6,0), com fluxo de 3,0mL/min. Após eluição de 100 mL do tampão, o material adsorvido à resina foi eluído com NaCl (0 a 1000 mM) no mesmo tampão, em procedimento “step wise”. As frações coletadas foram agrupadas de acordo com o perfil de proteínas, dialisadas contra água destilada, concentradas com polietileno glicol 20.000, até se obter um volume final ajustado para 20 mL. Estas frações foram utilizadas em novo bioensaio.

3.2.2.16 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia

As plantas de tomate foram tratadas novamente com aSm (0,05 g/L), com o extrato aquoso do Le-96/17 e com as frações obtidas na CTA, quando estas apresentaram um par de folhas definitivas totalmente expandidas. A inoculação de Rs47 foi feita conforme Lopes (1981) e de To534 conforme Kronka (2004), em casa-de-vegetação com 10 repetições/tratamento, em delineamento experimental completamente casualizado. Foram avaliados a porcentagem de folhas murchas, o peso fresco e seco das plantas. As avaliações ocorreram aos 5 e 10 dias após a inoculação com Rs47 e a cada 5 dias após a inoculação, com To534. Os tratamentos são descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Tratamentos com água, com acibenzolar-S-metil (aSm), com extrato aquoso do cogumelo *Lentinula edodes* (Le-96/17) e suas frações obtidas através da cromatografia de troca aniônica (CTA). As plantas de tomate foram tratadas com água ou inoculadas com *R. solanacearum* (Rs47) ou *C.michiganensis* (To534) dois dias depois de tratadas

Tratamento	Agente aplicado	Concentração	Inoculação
T1	Água	-	Água
T2	Água	-	Rs47 ou To534
T3	aSm	0,05 g/L	Rs47 ou To534
T4	Le-96/17	10% (v/v)	Rs47 ou To534
T5	Le-96/17 1ª fração	-	Rs47 ou To534
T6	Le-96/17 2ª fração	-	Rs47 ou To534
T7	Le-96/17 3ª fração	-	Rs47 ou To534
T8	Le-96/17 4ª fração	-	Rs47 ou To534
T9	Le-96/17 5ª fração	-	Rs47 ou To534
T10	Le-96/17 6ª fração	-	Rs47 ou To534

3.2.2.17 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas

O precipitado 40-80% de Le-96/17 e as frações obtidas em CTA do precipitado 40-80% foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante descontínuo, de acordo com o procedimento de Laemmli (1970). O gel separador foi preparado na concentração de 10% de acrilamida e o gel concentrador na concentração de 4%, sendo a eletroforese conduzida sob voltagem de 90V a 4°C, por um período de 2,5 h.

Após preparar o gel, 20 µL de cada amostra foram misturados em tubos tipo eppendorf com 20 µL de tampão desnaturante [62,5 mM de fosfato de sódio pH 7,0; glicerol 10% (v/v); SDS 2% (m/v); azul de bromofenol 0,001% (m/v)], sendo estes tubos aquecidos em banho-maria por 5 min e posteriormente as amostras aplicadas em pocinhos no gel.

Com o término da eletroforese, o gel foi retirado e imerso em solução corante [azul de comassie R250 1% (m/v); etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v)], permanecendo 12 h sob agitação. O gel foi então lavado com água destilada e imerso em solução descorante [etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v); água destilada 40% (v/v)], permanecendo sob agitação por um período de 4 h, onde foram realizadas três trocas da solução descorante.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Efeito *in vitro* de *L. edodes* e *A. blazei* sobre *C. michiganensis* **subsp.** *michiganensis* e *R. solanacearum*

Nos testes *in vitro* realizados para *R. solanacearum*, nenhum dos extratos aquosos de *A. blazei* ou *L. edodes* inibiu o crescimento da bactéria, sendo que alguns tratamentos até estimularam o crescimento da bactéria (Figura 14). Já para os testes *in vitro* realizados para *C. michiganensis* (Figuras 15 e 16), o tratamento com aSm no 1º teste *in vitro* e o tratamento Le-96/22 10% no 2º teste *in vitro* mostraram algum efeito na diminuição do crescimento da bactéria, quando comparados com os demais tratamentos. Porém, essa diminuição no crescimento não ocorreu quando da repetição do teste, não sendo possível comprovar o efeito direto do extrato aquoso de cogumelo ou do indutor aSm no crescimento da bactéria.

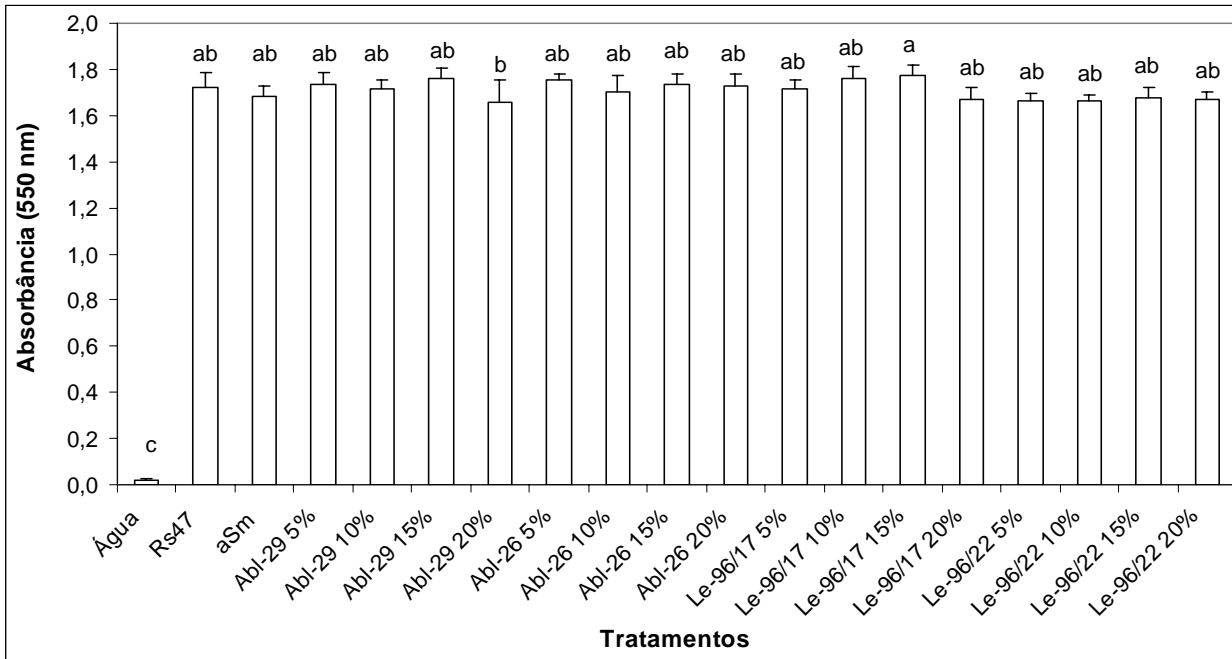


Figura 14 – Efeito direto do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e de *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum* (Rs47), no primeiro teste *in vitro*. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela Água e Rs47

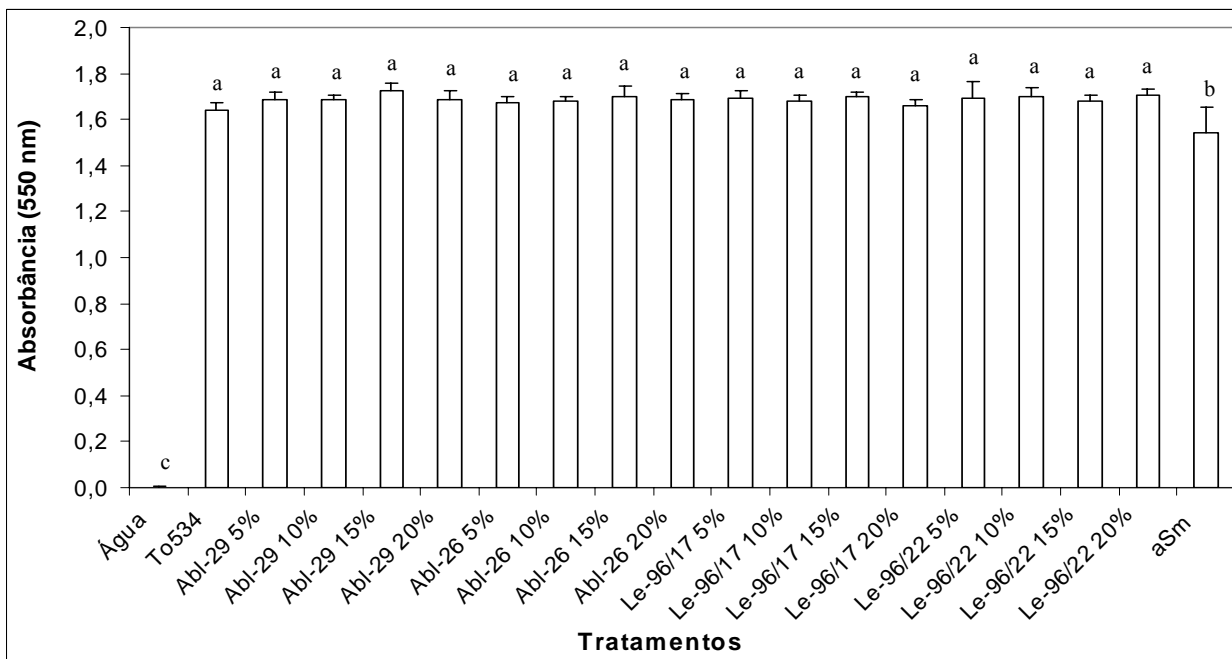


Figura 15 – Efeito direto do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e de *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (To534), no primeiro teste *in vitro*. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela Água e To534

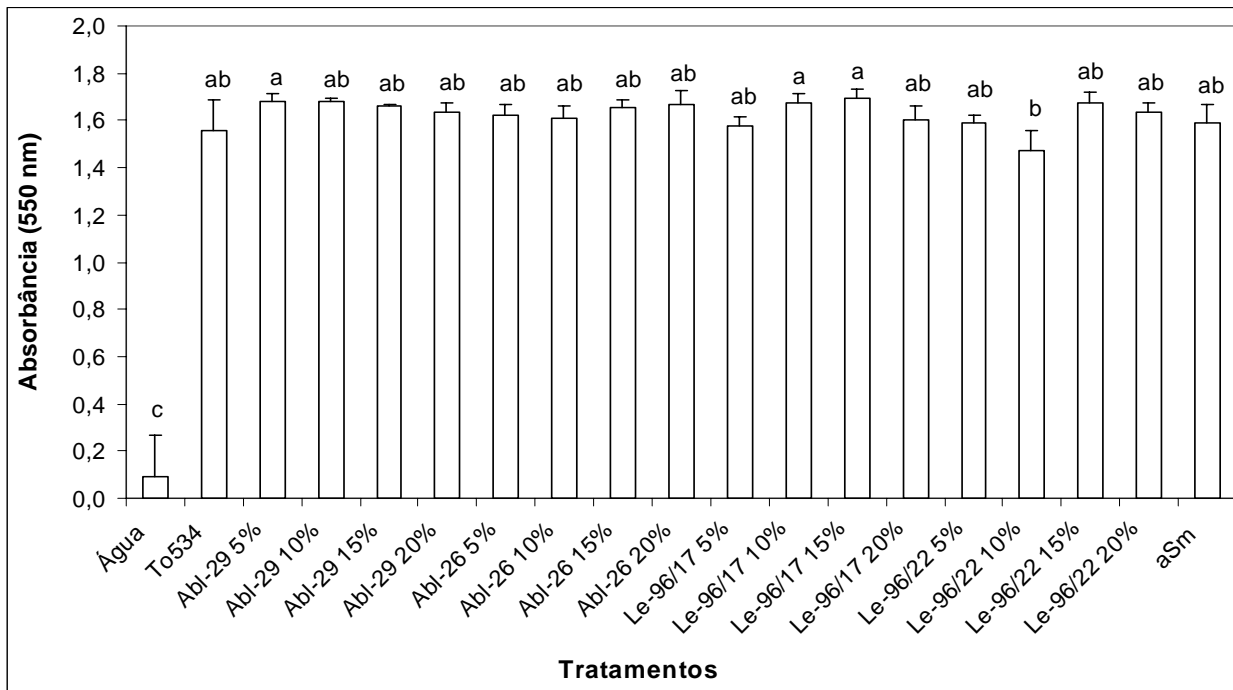


Figura 16 – Efeito direto do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e de *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (To534), no segundo teste *in vitro*. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela Água e To534

3.2.3.2 Proteção de plantas em casa-de-vegetação

O experimento realizado em casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum*, utilizando o indutor acibenzolar-S-metil e os extratos aquosos de *L. edodes* e *A. blazei*, foi realizado em duplicata. Os resultados obtidos nos dois experimentos foram semelhantes, sendo apresentado os resultados de apenas um dos experimentos.

Os resultados da Figura 17 mostram que o extrato aquoso Le-96/17 10% (v/v) e o indutor acibenzolar-S-metil (aSm) proporcionaram a menor ocorrência de folhas murchas, em relação aos demais tratamentos. Quando analisamos o efeito dos tratamentos sobre o peso fresco e seco das plantas de tomate (Figura 18), o tratamento Le-96/17 10% proporcionou maior peso nas plantas de tomate, juntamente com as plantas tratadas somente com água.

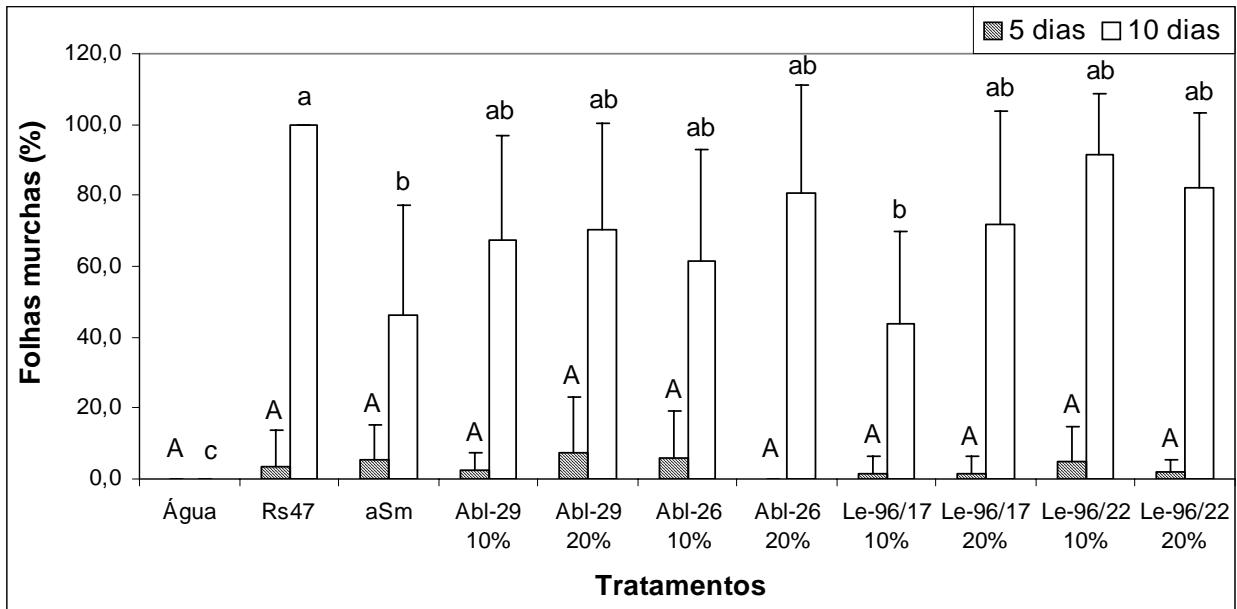


Figura 17 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs47). As barras representam a 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 Rs47

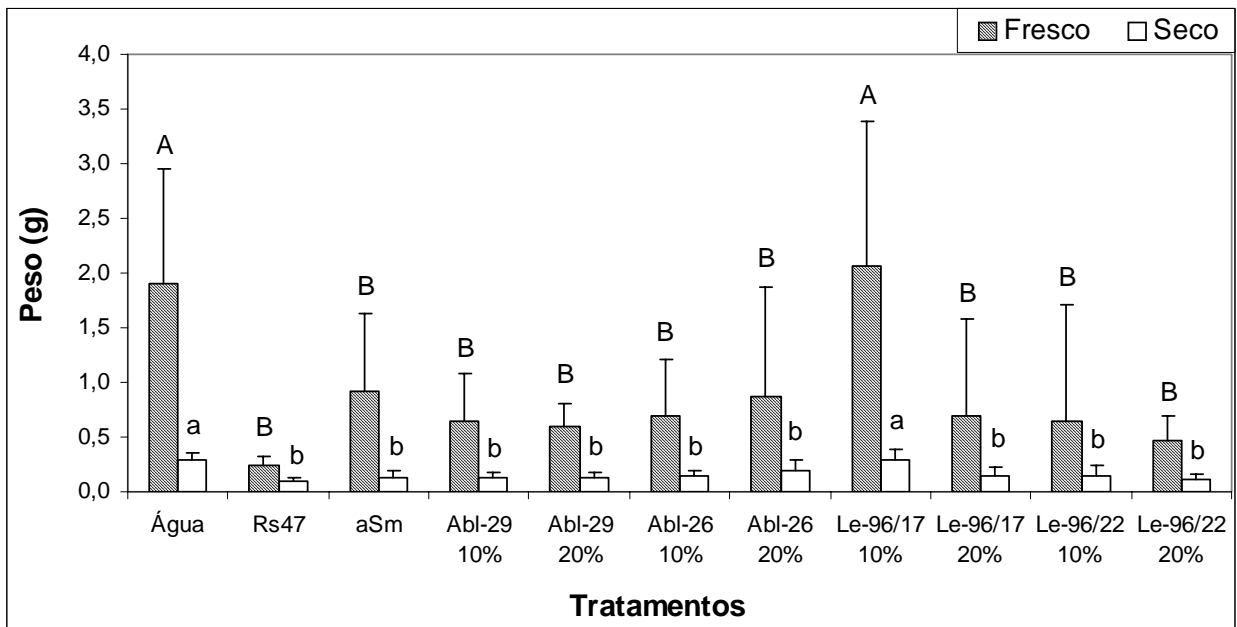


Figura 18 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o peso fresco e seco das plantas de tomate. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco. Os tratamentos controle são representados pela Água e Rs47

No caso do experimento realizado em casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de tomate contra *C. michiganensis*, o qual também foi realizado em duplicata, foram realizadas nove avaliações, durante um período de 45 dias após a inoculação com a bactéria. Podemos observar na Figura 19 apenas as três últimas avaliações, cujos resultados mostram que, assim como nos experimentos com *R. solanacearum*, o extrato aquoso Le-96/17 10% (v/v) e aSm proporcionaram uma menor ocorrência de folhas murchas, sendo portanto mais eficientes no controle da doença. Entretanto, quando analisamos o peso fresco e o peso seco (Figura 20), as plantas tratadas com Abl-29 tiveram maior peso que todos os demais tratamentos, inclusive em relação às plantas tratadas somente com água. Já os tratamentos que melhor controlaram a doença, Le-96/17 e aSm, tiveram valores próximos ao das plantas tratadas somente com água. No caso do peso dos frutos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

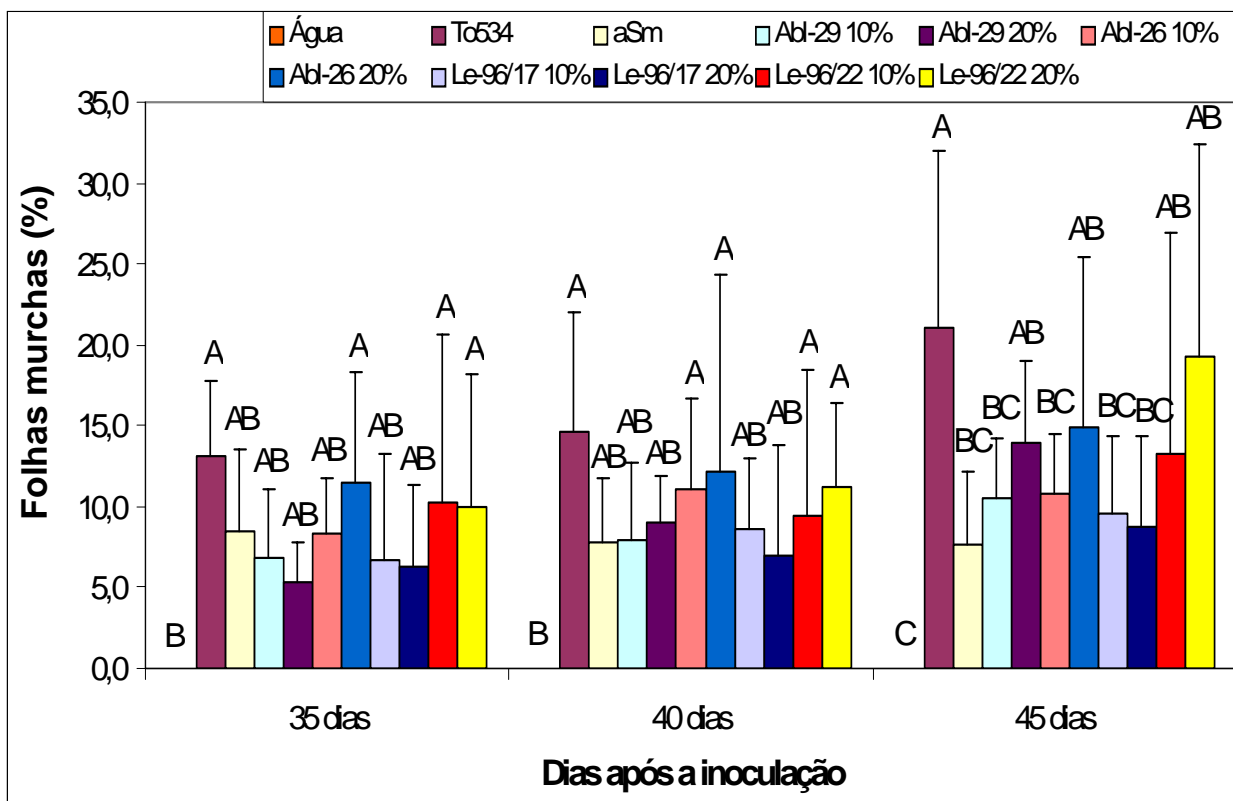


Figura 19 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (To534). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela Água e To534

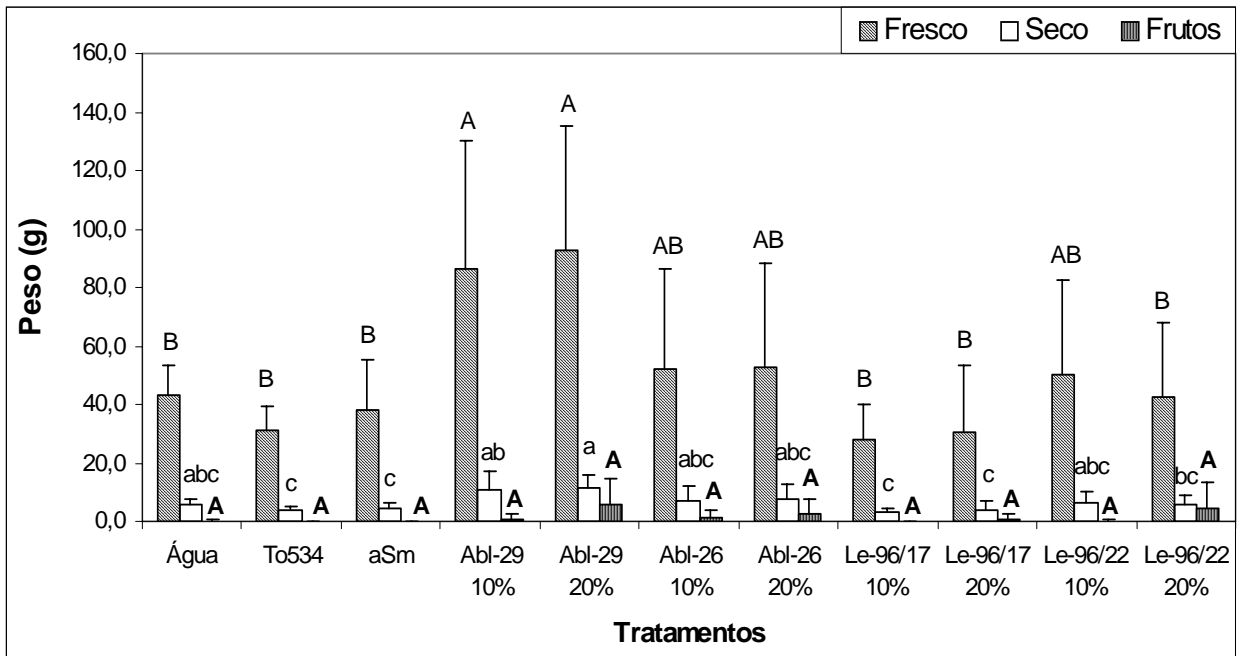


Figura 20 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26 e Abl-29) e *Lentinula edodes* (Le-96/17 e Le-96/22), em diferentes concentrações, sobre o peso fresco e seco da parte vegetativa e peso dos frutos das plantas de tomate. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os tratamentos controle são representados pela Água e To534

3.2.3.3 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática

No bioensaio conduzido no patossistema tomate/*Clavibacter*, visando avaliar a atividade enzimática entre os diferentes tratamentos indutores e sem a inoculação da bactéria, podemos observar um aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase nos tratamentos aSm, Abl-26 e Le-96/17, no 4º dia após o tratamento (Figura 21 D). No 12º, 17º e 22º dias após o tratamento, as plantas tratadas com aSm exibiram maior atividade que os demais tratamentos. A quantidade de proteínas foi maior nos tratamentos aSm, Abl-26 e Le-96/17 no 4º dia após o tratamento, em relação ao tratamento Água (Figura 21 A).

Quando observamos a atividade de peroxidase e quitinase (Figuras 21 B e 21 C), estas tiveram aumento significativo nos tratamentos indutores em relação ao tratamento Água somente nas últimas avaliações (17º e 22º dia). O aSm teve um aumento na atividade de peroxidase a partir do 7º dia após o tratamento (Figura 21 B). Já a atividade de polifenoloxidase, em função do aSm, Abl-26 e Le-96/17, diferiram do tratamento Água a partir do 7º dia após o tratamento, mostrando uma elevada atividade desta enzima no tratamento aSm no 17º dia após o tratamento (Figura 21 E).

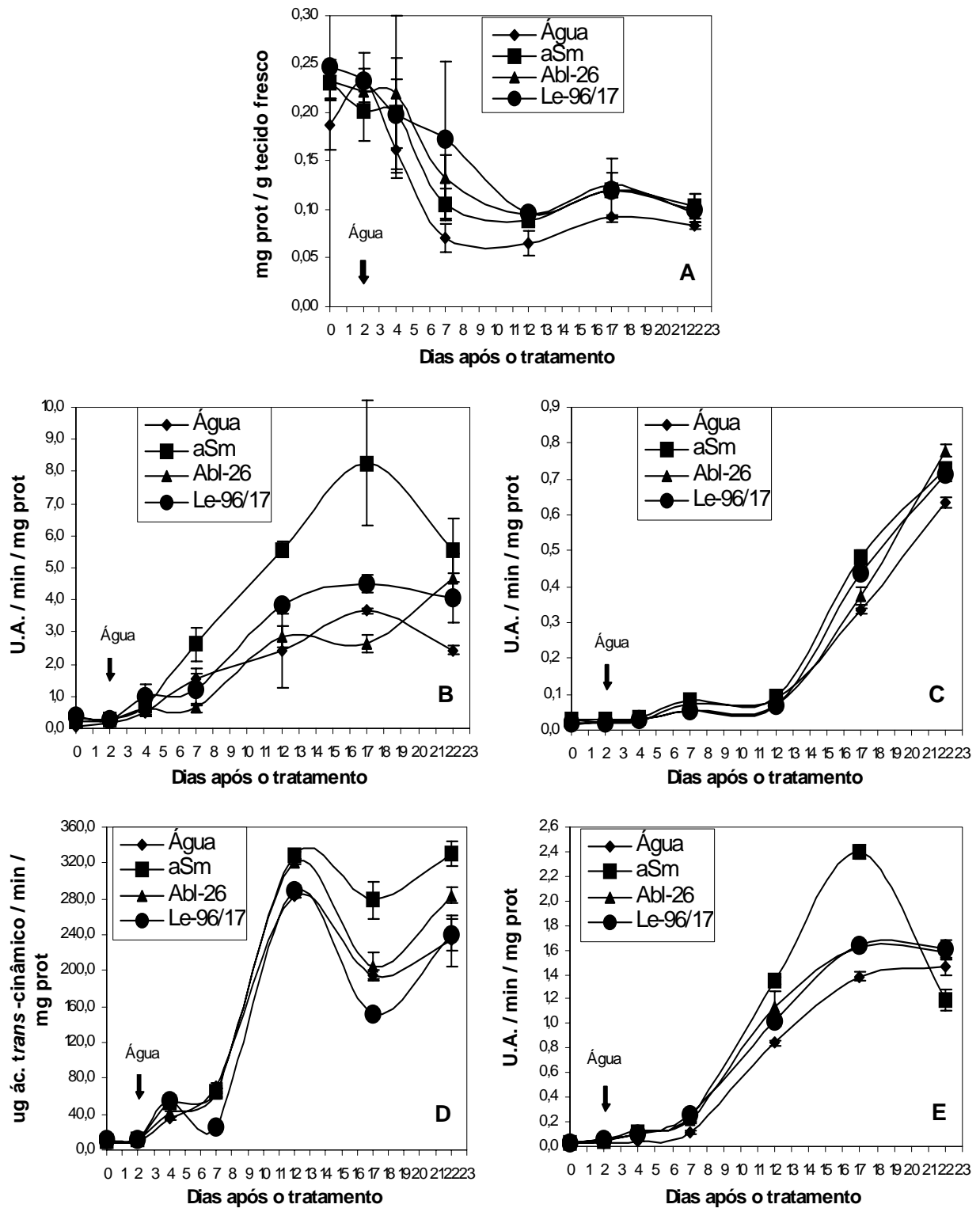


Figura 21 – Concentração de proteínas (A) e atividade das enzimas peroxidase (B), quitinase (C), fenilalanina amônia-liase (D) e polifenoloxidase (E), em folhas de tomateiro, em resposta a aplicação do indutor acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26) e *Lentinula edodes* (Le-96/17), no patossistema tomate/*Clavibacter*. A seta indica o momento do tratamento com água, dois dias após o tratamento das plantas com os indutores. Barras representam à média \pm desvio padrão

No bioensaio conduzido no patossistema tomate/*Ralstonia*, visando avaliar a atividade enzimática entre os diferentes tratamentos indutores e sem a inoculação da bactéria, verificou-se que a quantidade de proteínas aumentou significativamente nos tratamentos indutores, diferindo do tratamento Água, no 1º e 4º dias após o tratamento (Figura 22 A). Entretanto, a atividade de peroxidase (Figura 22 B) teve um aumento significativo nos tratamentos aSm, Abl-26 e Le-96/17, em relação à testemunha no 3º dia após o tratamento, um dia após o tratamento com água destilada autoclavada, via ferimento radicular. A peroxidase voltou a aumentar novamente no 7º e 12º dias após o tratamento.

As atividades de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase também exibiram aumento de suas atividades nos tratamentos com os indutores, em relação ao tratamento Água, no 3º e 7º dias após os tratamentos, ocorrendo o aumento destas atividades um e cinco dias após o tratamento com água destilada autoclavada, via ferimento radicular (Figuras 22 C, 22 D e 22 E).

Quando comparamos os tratamentos indutores com o tratamento Água, com a inoculação de *R. solanacearum*, as atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase foram menores (Figura 23). Na avaliação de quitinase, o tratamento aSm ocasionou maior atividade no 7º dia após o tratamento (Figura 24 D). Por sua vez, os tratamentos Abl-26 e Le-96/17 ocasionaram baixa atividade desta enzima nas avaliações, exceto no 3º dia após os tratamentos (Figuras 24 E e 24 F).

Houve um aumento significativo na concentração de proteínas nas plantas tratadas com Le-96/17 em relação às plantas tratadas com água, a partir do 4º dia após o tratamento (dados não mostrados). Para os demais tratamentos indutores não ocorreram diferenças significativas em relação às plantas tratadas com água (dados não mostrados). A atividade de peroxidase para as plantas tratadas com aSm e Abl-26 e inoculadas com Rs47 foi significativa no 7º e 12º dias após o tratamento, respectivamente (Figuras 24 A e 24 B). Para Le-96/17 houve um aumento significativo na atividade das plantas inoculadas com bactéria apenas no 3º dia após o tratamento, ou seja, um dia após a inoculação (Figura 24 C).

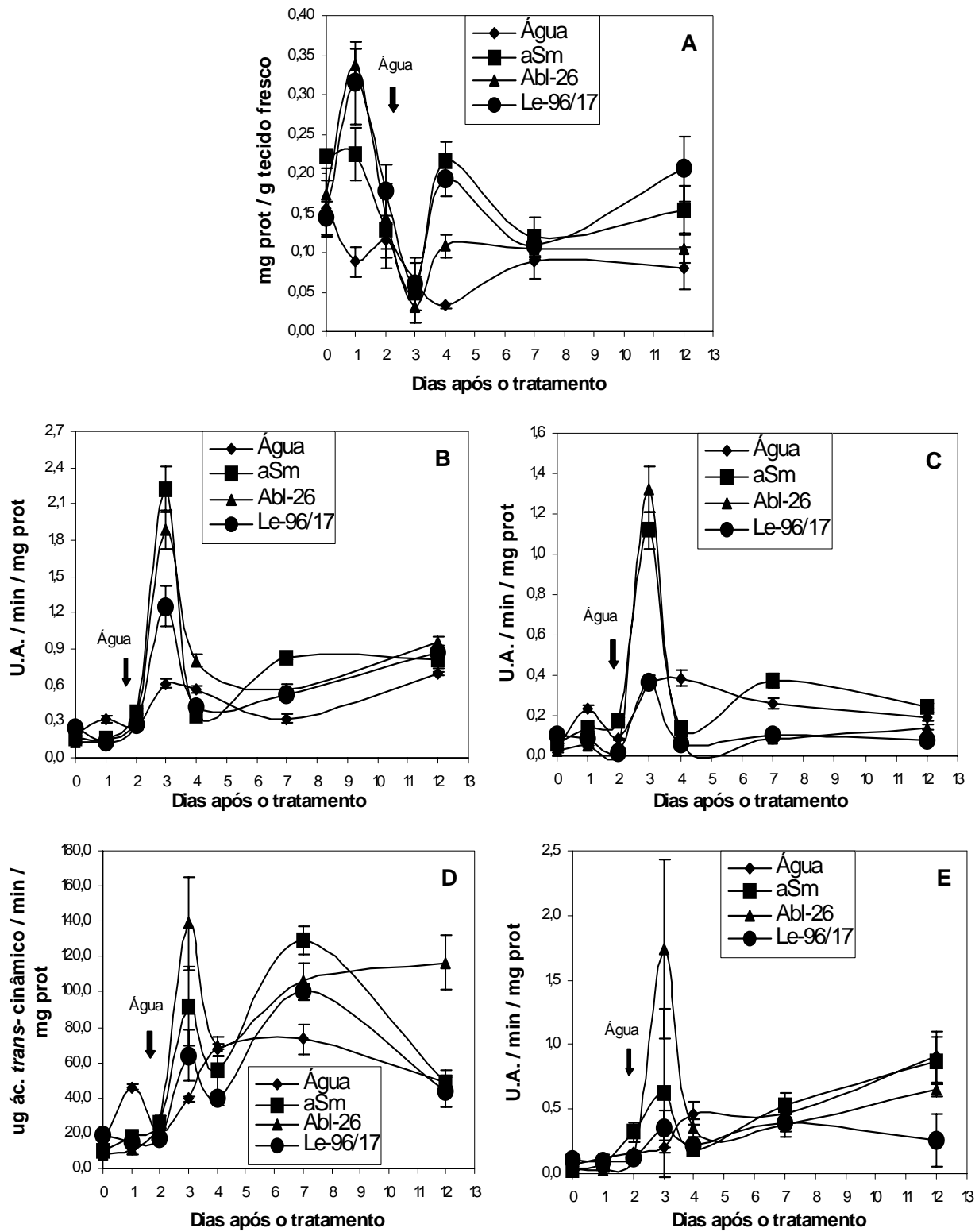


Figura 22 – Concentração de proteínas (A) e atividade das enzimas peroxidase (B), quitinase (C), fenilalanina amônia-liase (D) e polifenoloxidase (E), em folhas de tomate, em resposta a aplicação do indutor acibenzolar-S-metil (aSm), dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* (Abl-26) e *Lentinula edodes* (Le-96/17), no patossistema tomate/*Ralstonia*. A seta indica o momento do tratamento com água, dois dias após o tratamento das plantas com os indutores. Barras representam à média \pm desvio padrão

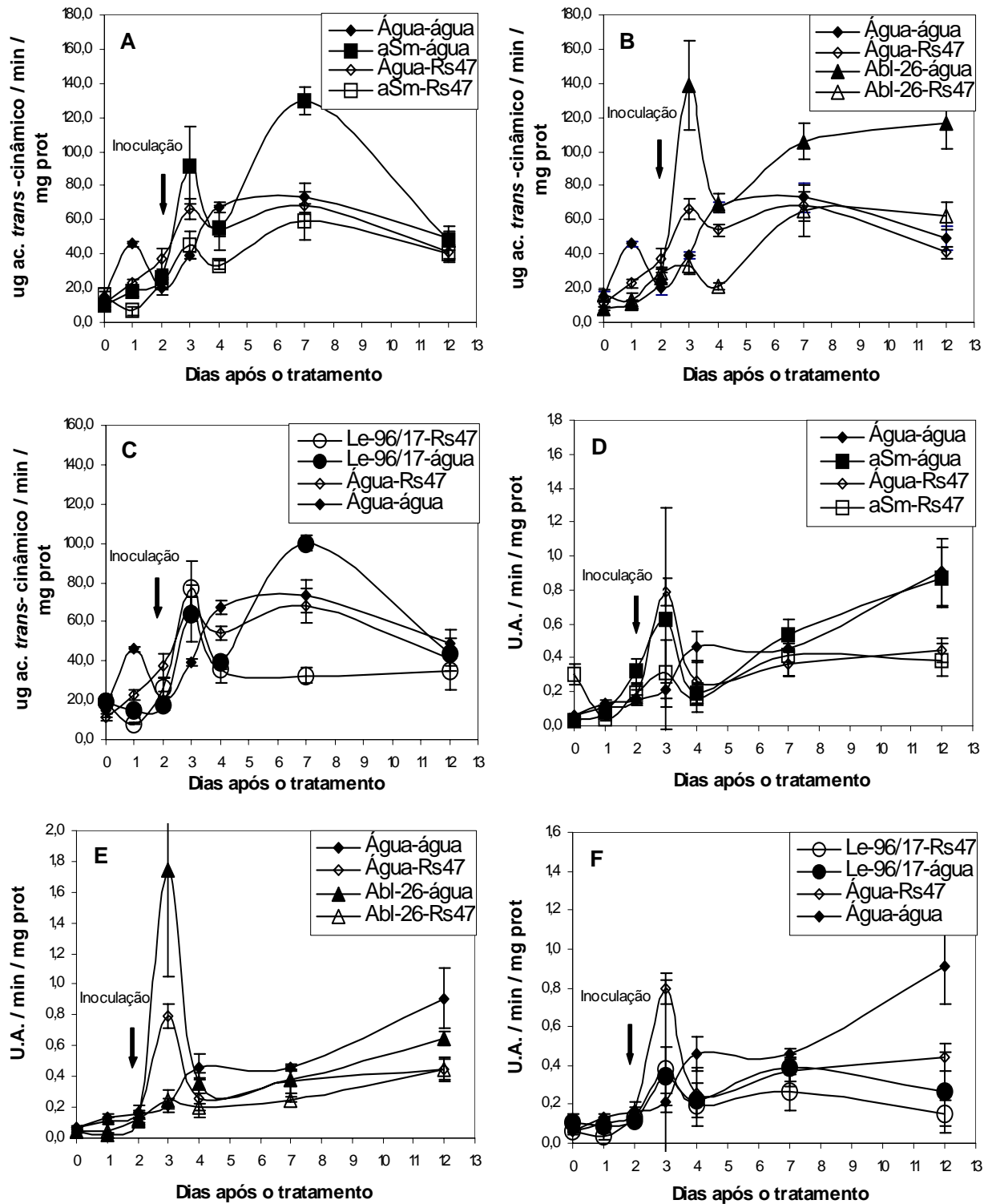


Figura 23 – Atividade de fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes*, Le-96/17 (C), e atividade de polifenoloxidase em resposta a aplicação de aSm (D) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-26 (E) e de *Lentinula edodes*, Le-96/17 (F), nas folhas de tomateiro. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

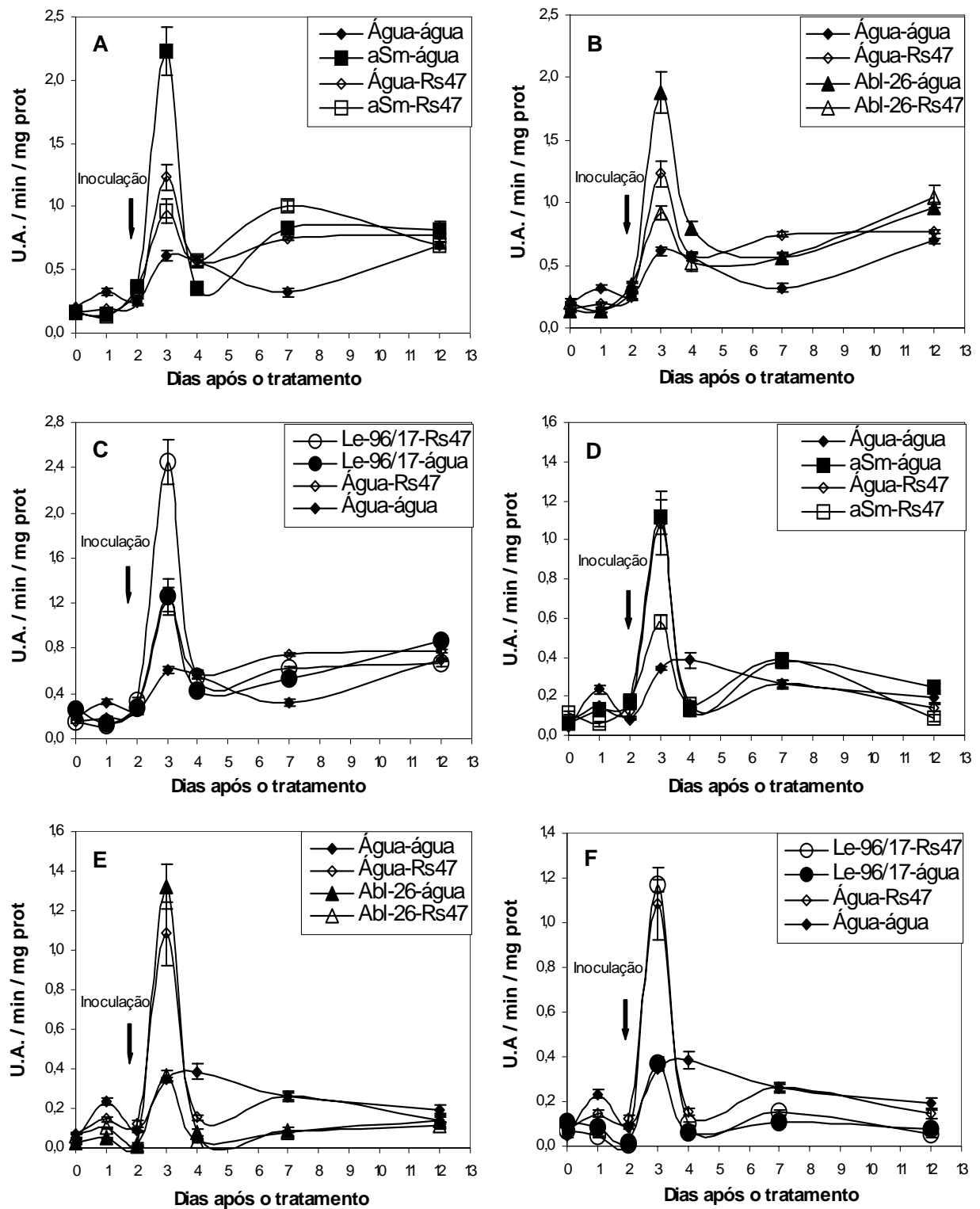


Figura 24 – Atividade de peroxidase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes*, Le-96/17 (C), e atividade de quitinase, após o tratamento com aSm (D), Abl-26 (E) e Le-96/17 (F), nas folhas de tomateiro. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *R. solanacearum* (Rs47), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

De maneira geral, não ocorreram diferenças na quantidade de proteínas entre os tratamentos indutores e o tratamento Água no patossistema tomate/*Clavibacter* (dados não mostrados). Entretanto, a atividade de peroxidase foi maior em todos os tratamentos indutores em relação à Água somente no 17º dia após o tratamento (Figuras 25 A, 25 B e 25 C). As plantas tratadas com aSm tiveram também uma maior atividade de peroxidase no 7º dia após o tratamento (Figura 25 A), ou seja, ocorreu um aumento na atividade desta enzima após 5 dias da inoculação da bactéria. Já para a quitinase, ocorreu aumento de sua atividade somente no 17º dia após o tratamento, para todos os tratamentos indutores (Figuras 25 D, 25 E e 25 F).

Quando analisamos as atividades de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, ocorreram aumentos nas atividades em todos os tratamentos indutores em relação às plantas tratadas com água no 4º dia após os tratamentos, ou seja, dois dias após as plantas terem sido inoculadas com a bactéria (Figura 26), em relação as plantas tratadas com água e inoculadas com a bactéria. Nas Figuras 26 A e 26 C, podemos observar que as plantas tratadas com aSm e Le-96/17 e, posteriormente inoculadas com a bactéria, tiveram um aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase, tanto no 4º como no 7º e 12º dia após o tratamento. A atividade máxima desta enzima ocorreu no 12º dia após o tratamento, tanto para aSm como para Le-96/17. De maneira semelhante, a atividade de polifenoloxidase sofreu um aumento em função dos tratamentos indutores em relação ao tratamento Água-To534, no 4º dia após o tratamento (Figuras 26 D, 26 E e 26 F). Porém, as plantas tratadas com aSm ou Le-96/17 e inoculadas com a bactéria, tiveram também um aumento na atividade desta enzima nos 7º, 12º, 17º e 22º dias após o tratamento (Figuras 26 D e 26 F), com atividade máxima no 17º dia, em relação as plantas tratadas com água.

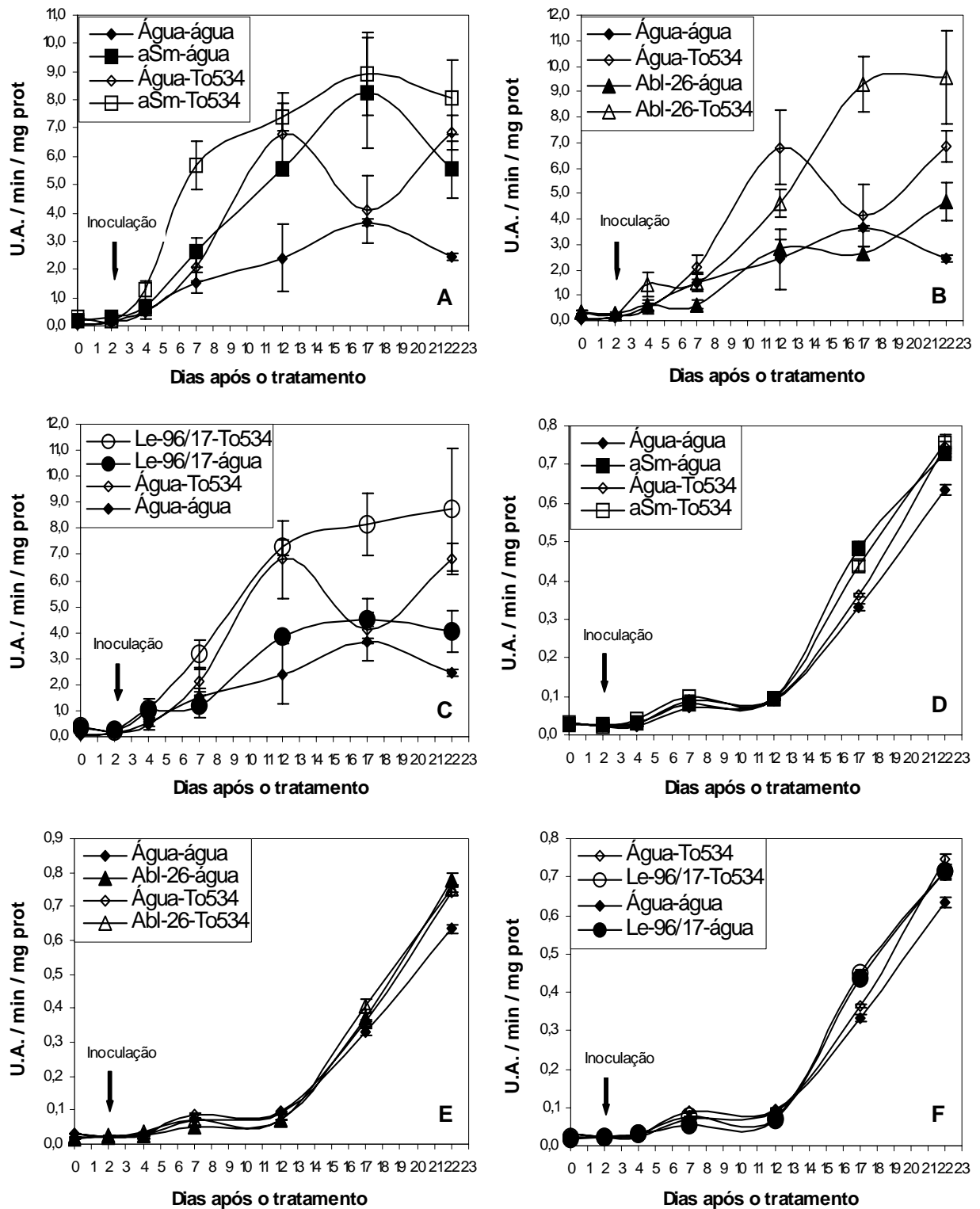


Figura 25 – Atividade de peroxidase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes*, Le-96/17 (C), e atividade de quitinase, após o tratamento com aSm (D), Abl-26 (E) e Le-96/17 (F), nas folhas de tomateiro. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *C. michiganensis* (To534), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

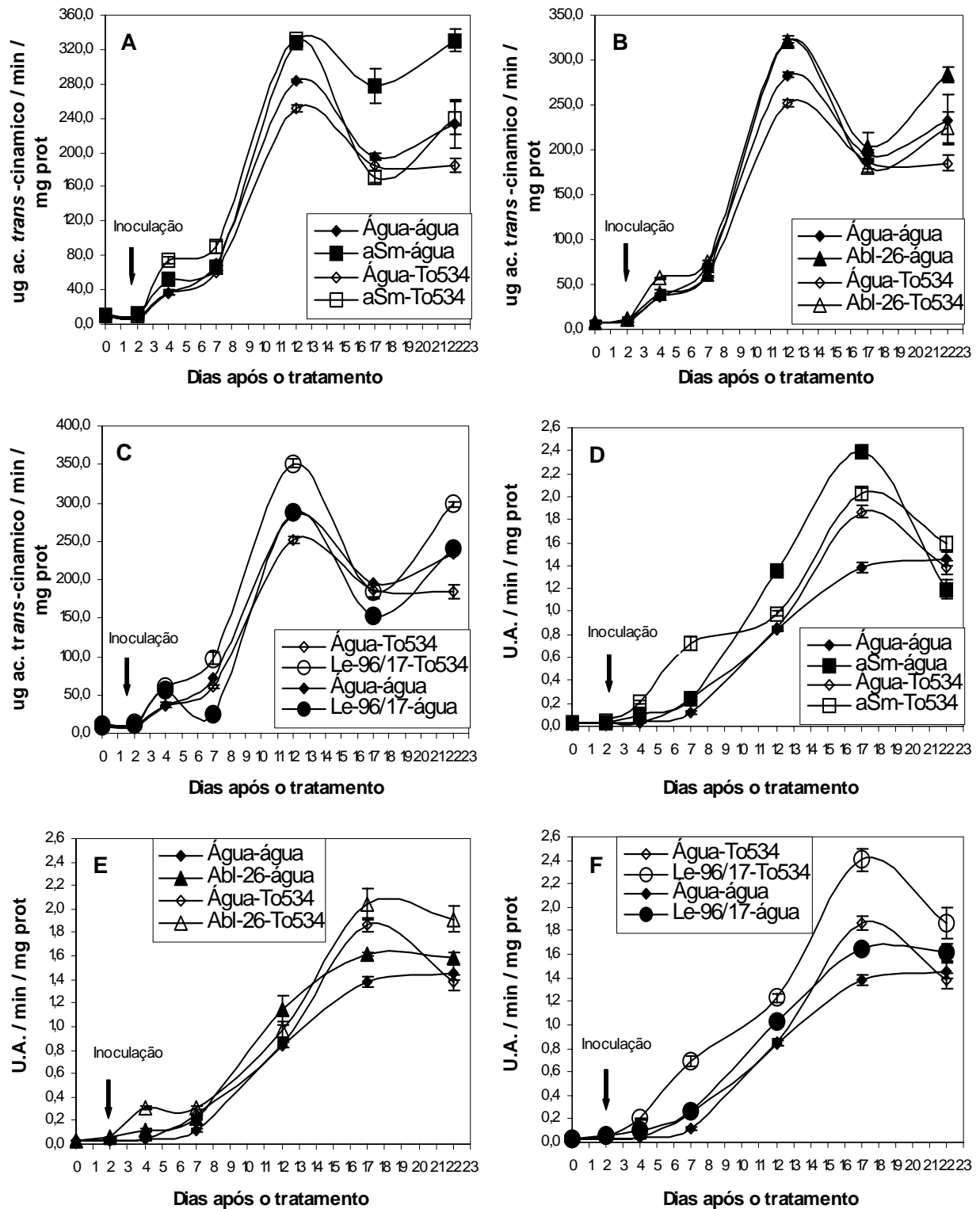


Figura 26 – Atividade de fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação de aSm (A) e dos extratos aquosos de *Agaricus blazei*, Abl-26 (B) e de *Lentinula edodes*, Le-96/17 (C), e atividade de polifenoloxidase, após o tratamento com aSm (D), Abl-26 (E) e Le-96/17 (F), nas folhas de tomateiro. A seta indica o momento do tratamento com água ou da inoculação com *C. michiganensis* (To534), dois dias após o tratamento das plantas. Barras representam à média \pm desvio padrão

3.2.3.4 Bioensaio dos componentes da precipitação com sulfato de amônio

Para os dois patossistemas estudados ocorreu uma menor porcentagem de folhas murchas quando utilizado o extrato aquoso Le-96/17 (Figuras 17 e 19). Desse modo, podemos observar na Figura 27 que, ao se aplicar o extrato aquoso de basidiocarpo de Le-96/17 e suas frações da precipitação, junto com o indutor acibenzolar-S-metil, no patossistema tomate/*Ralstonia*, as frações 40-60% e 60-80%, o extrato aquoso de Le-96/17 e o aSm proporcionaram uma menor ocorrência de folhas murchas em relação ao tratamento Rs47.

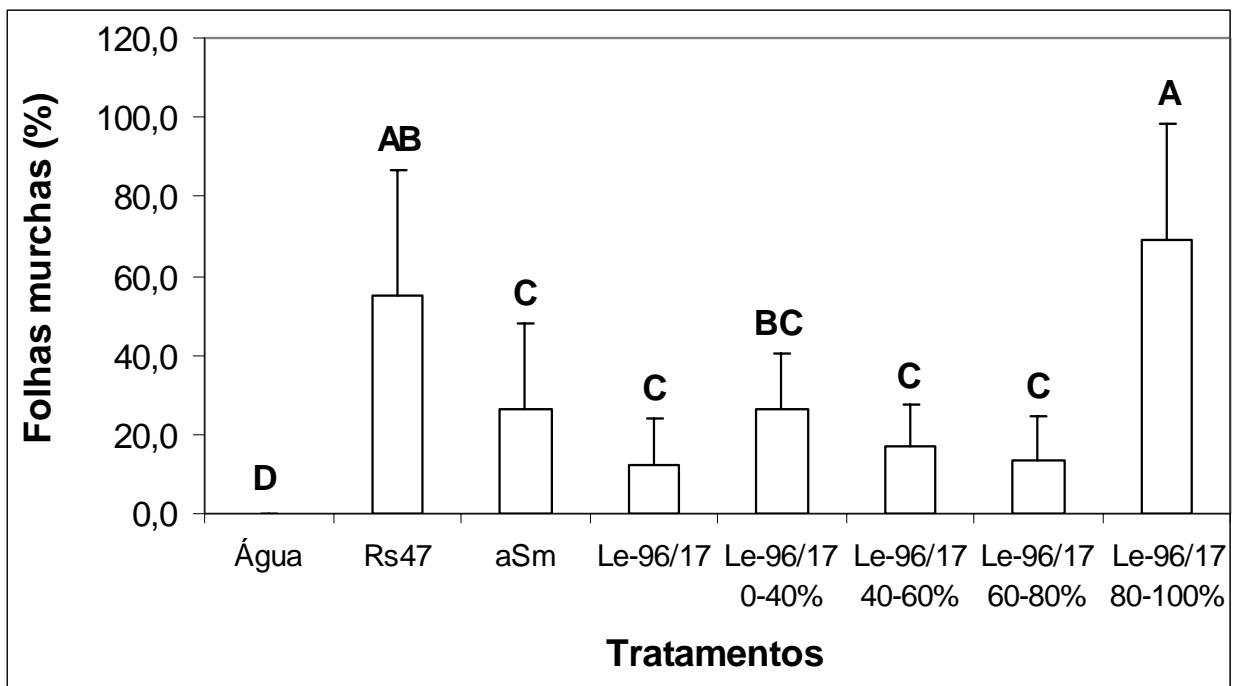


Figura 27 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações precipitadas com sulfato de amônio (Le-96/17 0-40%; Le-96/17 40-60%; Le-96/17 60-80%; Le-96/17 80-100%) sobre a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs47). As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Avaliação realizada aos 10 dias após a inoculação

Entretanto, quando analisamos o efeito dos tratamentos sobre o peso das plantas de tomate, podemos observar que somente o tratamento Água ocasionou maior peso fresco e seco em relação aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente (Figura 28).

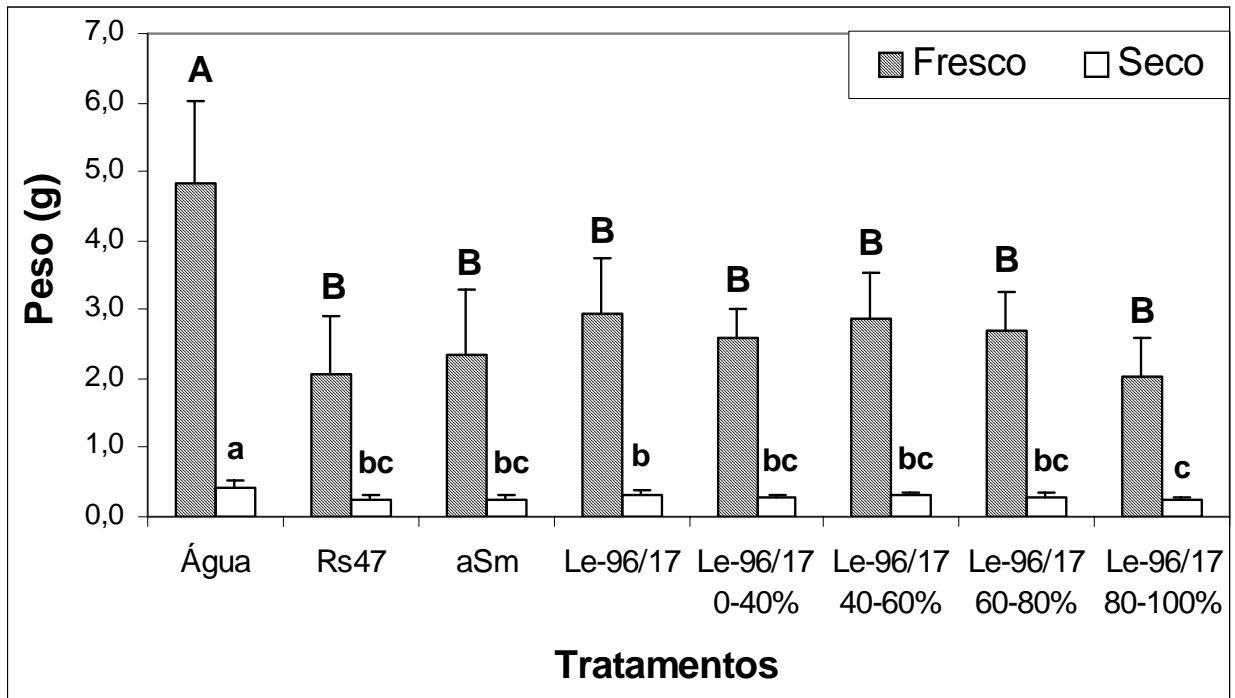


Figura 28 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações precipitadas com sulfato de amônio (Le-96/17 0-40%; Le-96/17 40-60%; Le-96/17 60-80%; Le-96/17 80-100%) sobre o desenvolvimento das plantas de tomate. Avaliação efetuada com base no peso fresco e seco. 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 ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco

3.2.3.5 Separação cromatográfica dos componentes das frações com atividade biológica

As frações 40-60% e 60-80% da precipitação em sulfato de amônio do extrato aquoso Le-96/17 proporcionaram a maior redução na ocorrência de folhas murchas em tomateiro (Figura 27). Desse modo, optou-se por submeter à fração precipitada 40-80% de Le-96/17 a uma cromatografia de troca aniônica (CTA), em tampão fosfato 25 mM (pH 6,0). Após o procedimento denominado de “step wise”, foram obtidas seis frações de cromatografia, ocorrendo uma maior concentração de proteínas na fração 4 (Figura 29). A cromatografia do precipitado 40-80% de Le-96/17 foi realizada mais uma vez, obtendo-se frações de CTA semelhantes. Estas frações foram concentradas com o uso de polietileno glicol 20.000 até um volume final de 20 mL e utilizadas em bioensaios com plantas de tomate contra *R. solanacearum* e *C. michiganensis*.

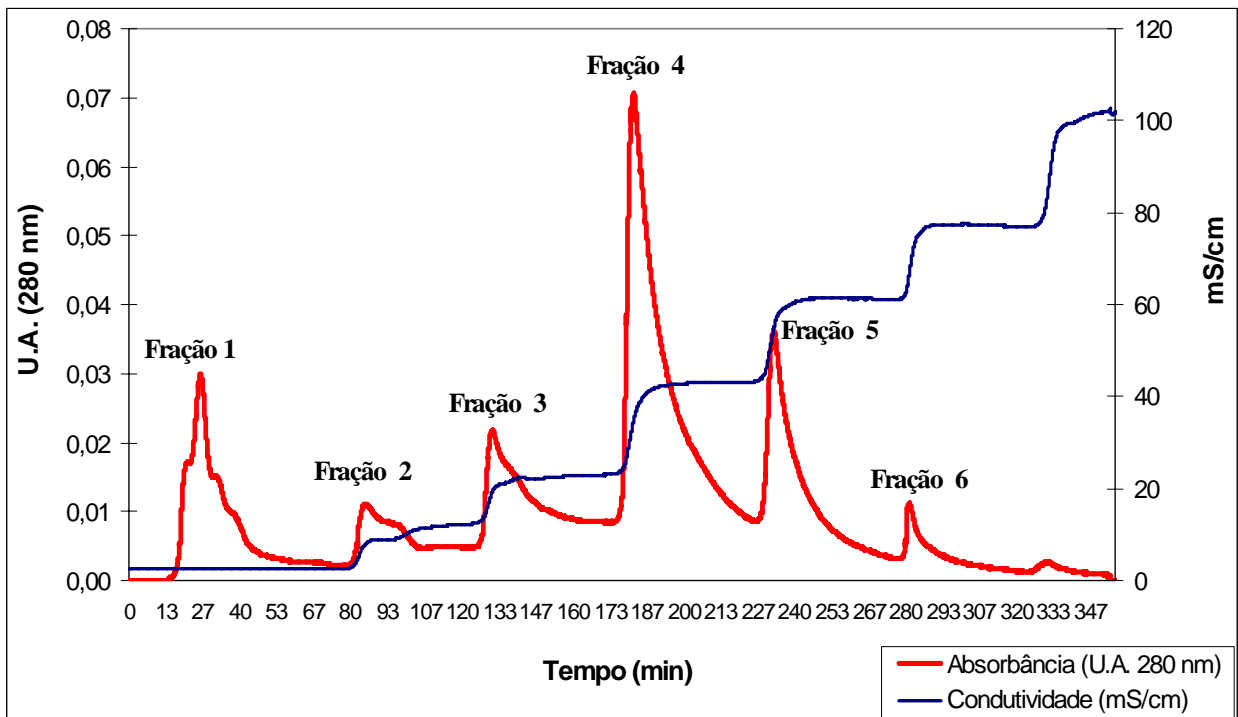


Figura 29 – Cromatografia de troca aniônica do precipitado 40-80%, obtido a partir do extrato aquoso de basidiocarpos de *Lentinula edodes* (Le-96/17) submetido ao tratamento com sulfato de amônio. O material foi aplicado em coluna preenchida com DEAE-Celulose e a cromatografia efetuada com tampão fosfato 25 mM (pH 6,0), em fluxo de 3,0 mL/min. O material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”

3.2.3.6 Bioensaio com as frações obtidas através da cromatografia

Depois de obtidas as frações através da CTA (Figura 29), estas foram aplicadas nas plântulas de tomate, visando verificar o efeito na redução da murcha de *R. solanacearum* e de *C. michiganensis*. As avaliações no experimento tomate/*Clavibacter* foram realizadas a cada 5 dias, após a inoculação. Podemos observar na Figura 30 que as frações 3 e 4, bem como o acibenzolar-S-metil e o extrato aquoso de Le-96/17, promoveram menor ocorrência de folhas murchas de tomate ao longo das avaliações. Com relação ao peso fresco e peso seco, as plantas do tratamento Água tiveram maior peso, sendo que os pesos das plantas dos demais tratamentos variaram pouco entre si (Figura 31).

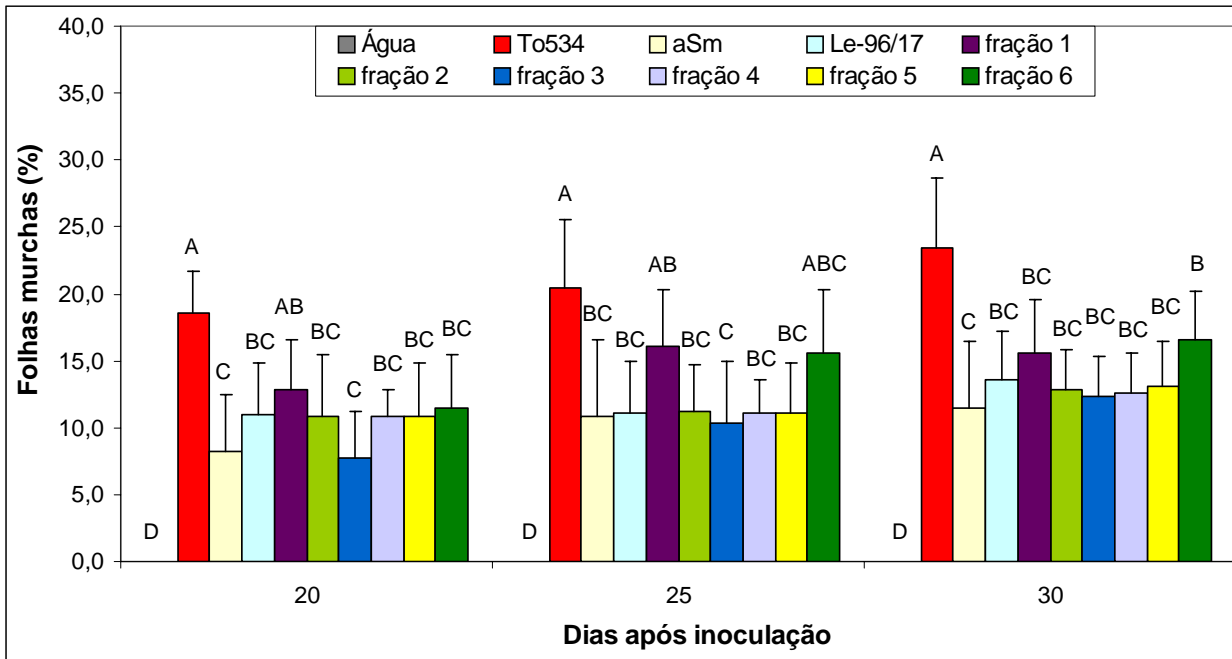


Figura 30 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações obtidas através da cromatografia (CTA) sobre a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causado por *C. michiganensis* (To534). As avaliações ocorreram a cada 5 dias após a inoculação com a bactéria. As barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%

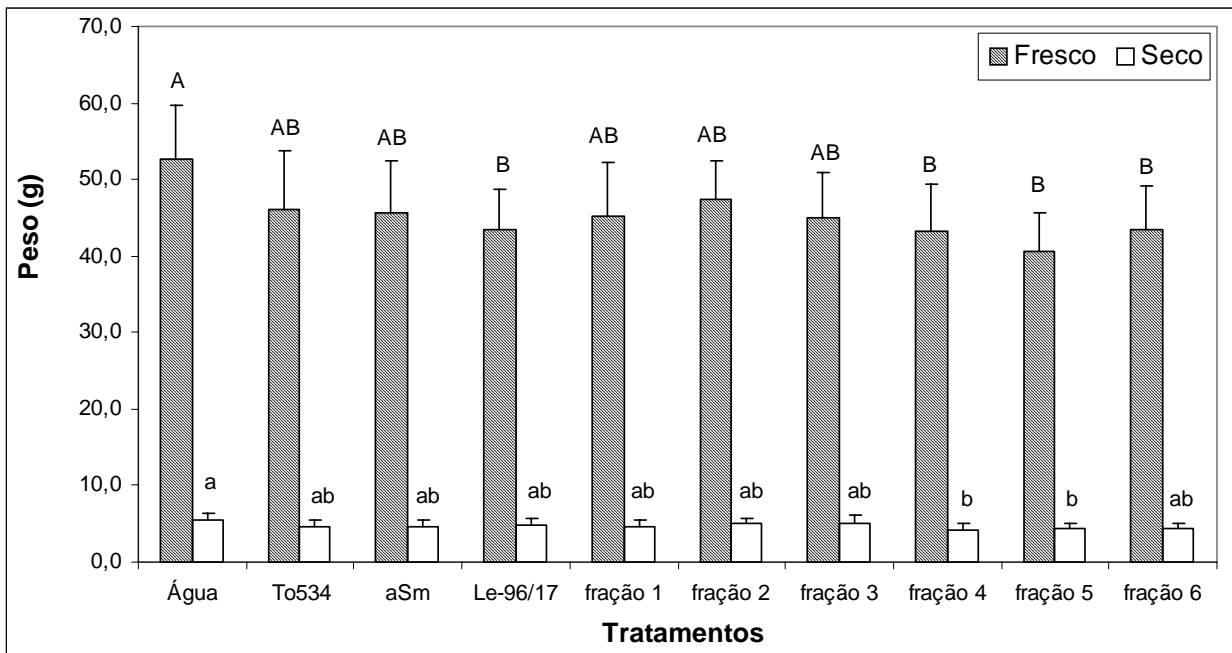


Figura 31 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações obtidas através da cromatografia (CTA) sobre o peso fresco e seco das plantas de tomate. As barras representam à média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco

De maneira semelhante, realizou-se o experimento para o patossistema tomate/*Ralstonia*, após a obtenção das frações da CTA do precipitado 40-80% de Le-96/17. As frações foram aplicadas nas plântulas de tomate, visando verificar seu efeito na redução da murcha de *R. solanacearum*. Os resultados podem ser observados na Figura 32, onde, assim como ocorreu no experimento tomate/*Clavibacter* (Figura 30), a fração 3, bem como o extrato aquoso de Le-96/17, ocasionaram menor ocorrência de folhas murchas de tomateiro nas avaliações. Com relação ao peso fresco e peso seco, as plantas do tratamento Água tiveram maior peso, seguidas pelos tratamentos Le-96/17 e fração 3 da CTA (Figura 33).

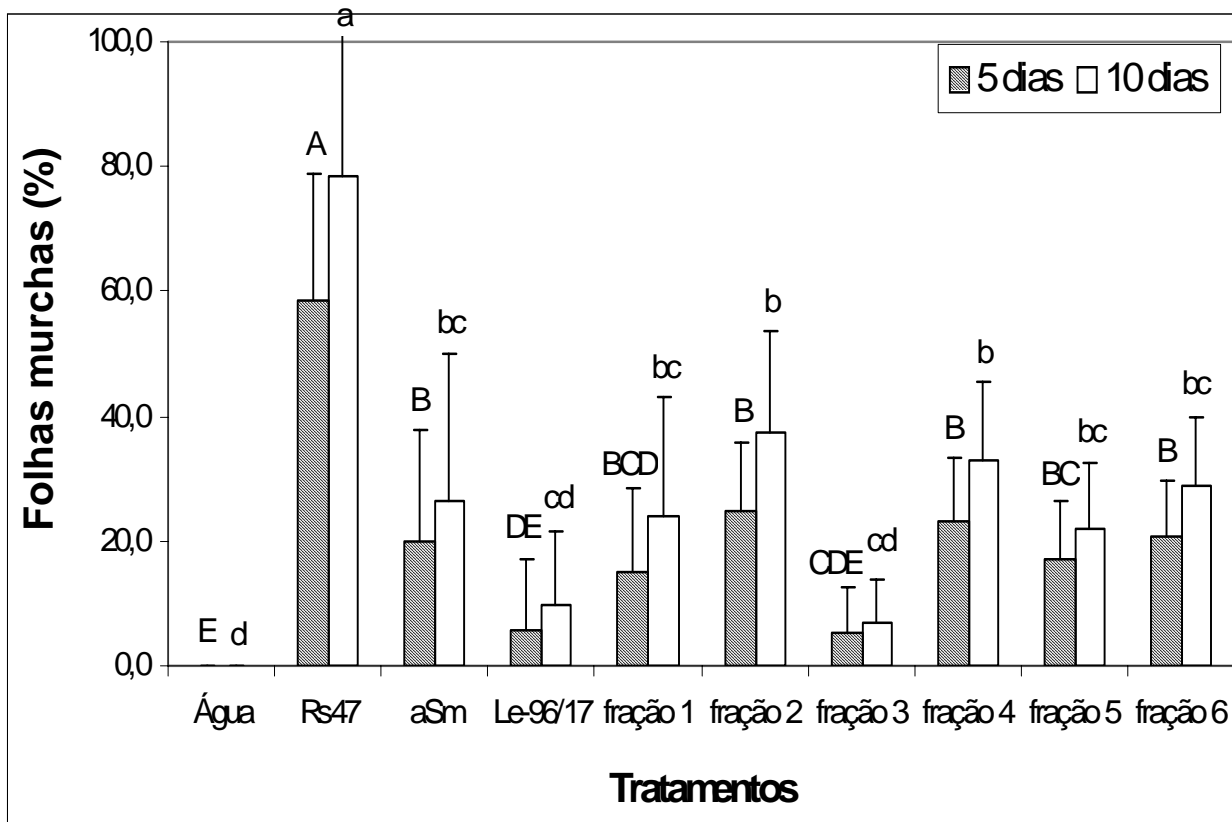


Figura 32 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações obtidas através da cromatografia de troca aniônica sobre a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causado por *R. solanacearum* (Rs47). As avaliações ocorreram aos 5 e 10 dias após a inoculação da bactéria. 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 a avaliação realizada aos 5 dias e as letras minúsculas referem-se a avaliação realizada aos 10 dias.

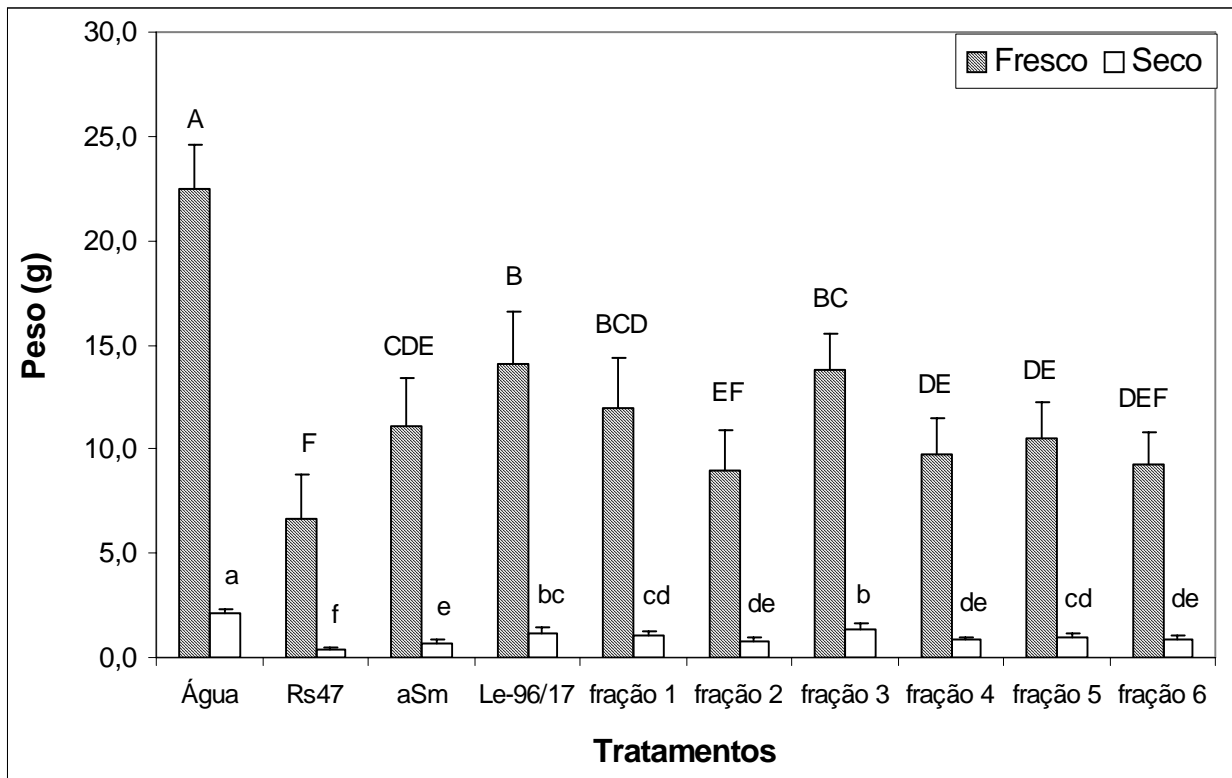


Figura 33 – Efeito do acibenzolar-S-metil (aSm), do extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Le-96/17) e de suas frações obtidas através da cromatografia de troca aniônica sobre o peso fresco e seco das plantas de tomate. As barras representam à média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As letras maiúsculas referem-se ao peso fresco e as letras minúsculas referem-se ao peso seco

3.2.3.7 Análise eletroforética das frações biologicamente ativas

O gel de poliacrilamida mostra pelo menos duas bandas no precipitado 40-80% e no extrato aquoso de Le-96/17, enquanto que nas frações 3 e 4, que foram as melhores na redução das doenças, podemos observar pelo menos duas bandas, com massa molecular de aproximadamente 29 e 37 kDa na fração 3 e uma de 45 kDa na fração 4 (Figura 34).

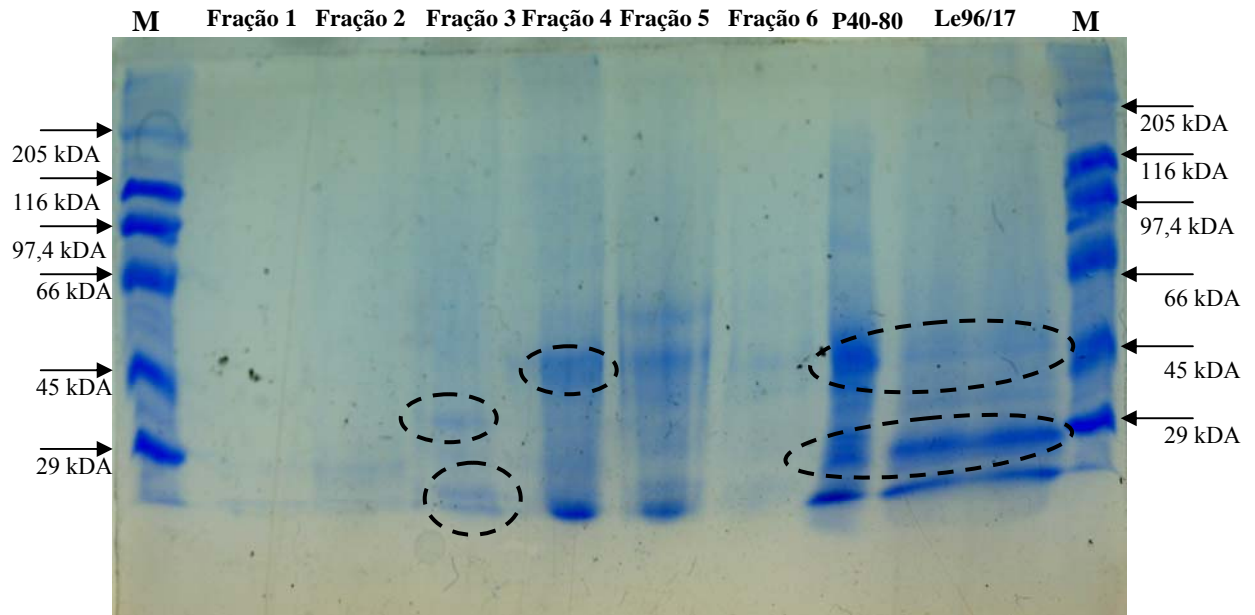


Figura 34 – Separação eletroforética em gel de poliacrilamida das frações da cromatografia de troca aniônica, do precipitado 40-80% e do extrato aquoso de Le96/17 de *Lentinula edodes*. Foi padronizada a quantidade de proteína aplicada no gel em 40 µg. M = marcador molecular de 29 a 205 kDa (SDS-200 Sigma®)

3.2.4 Discussão

Nos testes *in vitro* para as bactérias *R. solanacearum* e *C. michiganensis*, nenhum dos extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* ou o indutor acibenzolar-S-metil (aSm) inibiu o crescimento da bactéria nos experimentos realizados. Alguns tratamentos com os cogumelos chegaram até a estimular o crescimento das bactérias, mostrando que ao invés de um possível efeito antibiótico, ocorreu provavelmente uma melhora na composição nutricional do meio com a presença destes extratos aquosos. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Di Piero e Pascholati (2004), onde os isolados de *L. edodes* utilizados não apresentaram efeito *in vitro* e os isolados de *A. blazei* chegaram até a estimular o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*. Porém, os efeitos *in vitro* podem variar, podendo-se obter resultados satisfatórios na inibição do crescimento de patógenos. No estudo do efeito inibitório *in vitro* de quatro linhagens de *L. edodes* (Le 10, 46, K2, Assai) sobre quatro espécies de fungos filamentosos de importância agrícola (*Helminthosporium euphorbiae*, *Helminthosporium* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis sojae*) e sobre o sorotipo Alagoas do vírus da estomatite vesicular (VSA), Sasaki et al. (2001) observaram uma variabilidade do efeito das linhagens de *L. edodes* sobre os patógenos. As linhagens K2 e

Le10 mostraram-se antagônicas sobre os fungos e as linhagens 46 e K2 foram eficientes na inibição do VSA. Neste trabalho, os resultados demonstraram o potencial de uso de linhagens de *L. edodes* no controle e na prevenção de vírus patogênico a animais e de fungos filamentosos.

L. edodes exerceu efeito fungistático *in vitro* sobre a levedura patogênica *Candida albicans* em estudo realizado com cinco espécies de cogumelos comestíveis (*L. edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota nameko*, *Macrolepiota banaerensis* e *Agaricus blazei*). O composto inibitório estava presente no basidiocarpo e no micélio, o qual também foi secretado no meio de cultivo, além de ser fungistático, mostrava-se termosensível e perdia sua atividade após 72 horas (PACCOLA et al., 2001).

Já no estudo da atividade antibacteriana do isolado Le1 de *L. edodes*, avaliou-se seu efeito *in vitro* sobre 20 espécies de bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, verificando-se um maior potencial inibidor do mesmo sobre bactérias Gram positivas (ISHIKAWA, 1998). Este comportamento indica possível atuação da(s) substância(s) inibidora(s) em nível de parede celular, sendo que neste estudo o *Bacillus subtilis* foi o microrganismo mais sensível. Em outro estudo, Ishikawa, Kasuya e Vanetti (2001) avaliaram a atividade antibacteriana de 35 isolados de *L. edodes* contra *Bacillus subtilis*, onde todos os isolados inibiram a bactéria e o isolado Le1 foi o que promoveu maior inibição.

O lixiviado micelial de um isolado de *L. edodes* também inibiu significativamente o crescimento de diversas bactérias fitopatogênicas, como *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, com base na formação de halo de inibição (PACUMBABA; BEYL; PACUMBABA JUNIOR, 1999).

Quando os extratos de basidiocarpo dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, juntamente com o acibenzolar-S-metil, foram utilizados em experimentos de casa-de-vegetação, visando avaliar a proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum* e *C. michiganensis*, houve uma menor porcentagem de folhas murchas nas plantas tratadas com o extrato de Le-96/17 10% (v/v) e com aSm. Estes mesmos tratamentos também proporcionaram as plantas um peso fresco e seco semelhante ao das plantas tratadas somente com água.

O acibenzolar-S-metil é um derivado benzotiadiazólico, capaz de atuar como análogo funcional do ácido salicílico. É uma molécula endógena sinalizadora de reações de defesa das plantas que, sendo ativadas, são representadas por barreiras bioquímicas e estruturais de plantas

geneticamente suscetíveis, possibilitando uma proteção de campo contra um amplo espectro de doenças em diversas espécies cultivadas (GORLACH et al., 1996; LOUWS; WILSON; CAMPBELL, 2001). Esta resistência observada nas plantas após o tratamento com aSm não ocorre devido a uma ação direta sobre os patógenos, uma vez que este produto não apresentou atividade antibiótica *in vitro*.

Alguns poucos trabalhos utilizando aSm contra bactérias já foram realizados. Em um destes trabalhos, Soyly, Baysal e Soyly (2003) demonstraram que o aSm reduziu a severidade de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em 75% aos 7 dias após a inoculação em plântulas de tomate, mantendo o mesmo nível de controle até os 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).

Silva et al. (2001) verificaram que o aSm promoveu proteção das plantas de tomate contra *R. solanacearum*, através de reduções significativas na incidência e severidade da doença, independente do modo de aplicação do produto. Além disso, quando o produto foi aplicado no solo, obteve-se uma redução na incidência de 70%, sendo que as plantas testemunhas apresentaram incidência superior a 62%. No presente trabalho o tratamento com aSm também foi aplicado no solo, proporcionando menor ocorrência de folhas murchas.

O desenvolvimento desta resistência sistêmica adquirida, na qual o aSm é um ativador, está associada com várias respostas celulares de defesa, como a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, as fitoalexinas, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, rápidas alterações na parede celular e no aumento de várias enzimas relacionadas com defesa (RYALS et al., 1996). Deste modo, devido ao extrato aquoso Abl-26 e Le-96/17 atuarem de maneira semelhante ao aSm na diminuição das doenças, buscou-se em novos bioensaios estudar quais proteínas poderiam estar envolvidas. Estudando o mecanismo de ação no controle de *R. solanacearum*, a atividade de peroxidase, para os tratamentos Le-96/17, aSm e Abl-26, foi significativa no 3º, 7º e 12º dia após o tratamento, respectivamente (Figuras 24 D, 24 E e 24 F). Estes níveis de peroxidase obtidos nas folhas tratadas com Le-96/17 (3º dia) e aSm (7º dia) podem ter contribuído na redução da porcentagem de folhas murchas, uma vez que estes dois tratamentos foram os melhores em relação a todos os outros. Porém, o acúmulo de peroxidase no tratamento aSm foi mais tardio nas plantas em relação ao momento de inoculação com a bactéria, o que poderia comprometer a participação desta enzima na proteção.

No momento da infecção, uma planta pode necessitar de uma atividade mínima de enzimas relacionadas à defesa para expressar sua resistência, sendo que níveis enzimáticos maiores desenvolvidos posteriormente seriam inefetivos. Não é claro se, após a infecção, o aumento dessas ou de outras enzimas relacionadas com a defesa das plantas está relacionado com a resistência ou com a expressão dos sintomas (JI; KUC, 1997; SCHNEIDER; ULLRICH, 1994). As análises realizadas para fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase mostraram não existir diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, ocorrendo ainda uma menor atividade nos tratamentos com indutores em relação às plantas tratadas com água. Na avaliação de quitinase, o tratamento aSm mostrou maior atividade apenas no 7º dia após o tratamento, sendo que os demais tratamentos não diferiram significativamente entre si.

No patossistema tomate/*Clavibacter*, a atividade de peroxidase foi maior em todos os tratamentos indutores em relação às plantas tratadas com água somente no 17º dia após o tratamento. As plantas tratadas com aSm tiveram também uma maior atividade de peroxidase no 7º dia após o tratamento, ou seja, 5 dias após a inoculação da bactéria. As plantas tratadas com Le-96/17 também tiveram um aumento na atividade de peroxidase no 7º dia após o tratamento, mas não diferiram significativamente das plantas tratadas com água e inoculadas com a bactéria.

Os dados no presente trabalho mostram um aumento na atividade de peroxidase 5 dias após a inoculação com a bactéria, para as plantas tratadas com aSm e, embora não significativo, um aumento também nas plantas tratadas com Le-96/17. Baysal, Soyly e Soyly (2003) constataram em seu trabalho que, plantas de tomate tratadas com aSm e inoculadas com *C. michiganensis*, tiveram maior atividade de peroxidase aos 5 dias após a inoculação com a bactéria. Este aumento foi correlacionado com a expressão de resistência induzida nas plantas de tomate tratadas com aSm.

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 ou com o fungo indutor em todas as cultivares. Os maiores estímulos nas atividades enzimáticas foram observados nas cultivares com maior resistência a doença.

Solorzano et al. (1996) apud Soares, Maringoni e Lima (2004), estudando a indução sistêmica da peroxidase e da polifenoloxidase, pela aplicação de NaH_2PO_4 em tomateiro,

concluíram haver uma relação entre essas enzimas e a resistência. As atividades foram maiores entre 10 e 15 dias, decaindo após 45 dias do tratamento.

A atividade de peroxidase tem sido implicada em uma variedade de processos relacionados com a defesa das plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexinas. Em tomate, a peroxidase é uma das enzimas que se acredita catalisar o último passo na lignificação. O reforço da parede celular da planta por lignina e fenólicos aumenta a resistência da planta à degradação enzimática da parede pelos patógenos, e atua como uma barreira mecânica ao ingresso de toxinas e penetração física através do protoplasto (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Já para a quitinase, ocorreu aumento de sua atividade somente no 17º dia após o tratamento, para todos os tratamentos indutores. Baysal, Soyly e Soyly (2003) obtiveram uma maior atividade de quitinase aos 2, 3, 5 e 7 dias após a inoculação com *C. michiganensis*, nas plantas tratadas com aSm.

O ácido salicílico é componente importante na resistência às doenças, sendo que sua rota pode representar o principal ponto no controle das respostas de defesa das plantas. A rota biossintética do ácido salicílico apresenta seu início com a conversão da fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico, sendo catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase. Esta conversão é o primeiro passo na via dos fenilpropanóides, os quais fornecem os precursores dos compostos fenólicos, lignina e fitoalexinas (RYALS et al., 1996; TSUGE et al., 2004 apud UMESHA, 2006). Nossos resultados na atividade de fenilalanina amônia-liase mostram que as plantas de tomate, tratadas com os indutores e desafiadas com *C. michiganensis* após dois dias, tiveram um aumento na atividade desta enzima tanto no 4º como no 7º e 12º dias após os tratamentos, tendo a maior atividade no 12º dia após os tratamentos, tanto para aSm como para Le-96/17, em relação as plantas tratadas com água.

Em seu trabalho, Umesha (2006) estudou a atividade de fenilalanina amônia-liase em diferentes genótipos de tomate, os quais possuíam vários graus de resistência e suscetibilidade ao cancro bacteriano, observando haver uma correlação entre a reação à doença e a atividade da enzima. Desse modo, verificou-se que quanto maior o grau de resistência do genótipo a doença, maior era a atividade da enzima, após 21 horas da inoculação. Nos genótipos suscetíveis ou altamente suscetíveis, a atividade da enzima foi próxima ou inferior ao das plantas sadias. Este trabalho mostrou que esta enzima está envolvida na resistência do tomate a *C. michiganensis*.

Apesar de realizar umas das coletas apenas aos dois dias após a inoculação com *C. michiganensis*, os resultados obtidos demonstram que, assim como no trabalho de Umesha (2006), as plantas tratadas com Le-96/17 e aSm exibiram um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase após a inoculação com a bactéria, evidenciando que estes tratamentos induziram a atividade da enzima nas plantas de tomate. Este aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, bem como da enzima peroxidase, ocorreu em plantas de trigo tratadas com aSm e posteriormente inoculadas com *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (STADNIK, 1999 apud SILVA, 2002).

A atividade de polifenoloxidase começou a aumentar nas folhas de tomateiro a partir do 4º dia após o tratamento (dois dias após a inoculação com *C. michiganensis*), para os tratamentos Le-96/17 e aSm, em relação aos tratamentos controle. A atividade máxima de polifenoloxidase nas plantas tratadas com Le-96/17 e aSm ocorreu no 17º dia após o tratamento. A polifenoloxidase catalisa a oxidação de fenóis para quinonas, na presença de oxigênio. A expressão de polifenoloxidase pode atuar como uma linha de defesa adicional na proteção de plantas a futuros ataques de patógenos e insetos (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 1995).

A importância da polifenoloxidase na resposta de defesa das plantas foi estudada por Li e Steffens (2002), os quais produziram plantas de tomate transgênicas, que expressavam altos níveis de polifenoloxidase. Estes tomates transgênicos, após serem inoculados com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, apresentaram poucas lesões nas folhas em relação aos controles, após sete dias da inoculação. Estes resultados sugerem um importante papel da oxidação fenólica catalizada pela polifenoloxidase em limitar o desenvolvimento da doença, mostrando claras evidências do envolvimento da polifenoloxidase na resistência do tomateiro ao patógeno bacteriano no processo de infecção.

Estudando a implicação do acúmulo de polifenoloxidase no desenvolvimento da resistência de uma gramínea anual da família das *Poaceae* [*Pennisetum glaucum* (L.)] contra *Sclerospora graminicola*, Niranjana Raj, Sarosh e Shetty (2006) verificaram que a atividade de polifenoloxidase foi significativamente maior nas plantas resistentes do que nas suscetíveis, com ou sem a inoculação do patógeno. O fato da atividade da enzima ser maior nas plantas resistentes do que nas suscetíveis indica que a polifenoloxidase pode ter um papel específico em ativar o desenvolvimento da resistência do hospedeiro.

Devido a menor porcentagem de folhas murchas para as plantas tratadas com Le-96/17 e aSm, além das respostas enzimáticas observadas, foi realizado experimento, no patossistema tomate/*Ralstonia*, com o extrato aquoso de Le-96/17 e suas frações da precipitação, junto com o aSm. Os resultados mostraram que os precipitados 40-60% e 60-80% de Le-96/17 proporcionaram uma menor porcentagem de folhas murchas, seguidas pelos tratamentos Le-96/17 e aSm, em relação ao tratamento Rs47. Partindo destes resultados, realizaram-se os experimentos com as frações obtidas da cromatografia de troca aniônica do precipitado 40-80% de Le-96/17, para os dois patossistemas. No experimento tomate/*Clavibacter*, as frações 3 e 4, bem como Le-96/17 e aSm, promoveram a menor ocorrência de folhas murchas de tomateiro ao longo das avaliações. Já no experimento tomate/*Ralstonia*, a fração 3 bem como o extrato aquoso de Le-96/17 promoveram a menor ocorrência de folhas murchas nas avaliações.

A separação eletroforética destas frações da CTA, do precipitado 40-80% e do extrato aquoso de Le-96/17 revelaram a presença de mais de uma banda no gel na fração 3 e 4 da CTA, no precipitado 40-80% e no extrato aquoso de Le-96/17. Estas frações da CTA, em razão da metodologia adotada para obtê-las, mostram predominantemente proteínas em sua constituição. As frações da CTA também elicitaram repostas de indução de resistência nas plantas de tomate. Existem outros elicitores protéicos, obtidos a partir de microrganismos, como no caso das proteínas da parede celular presentes no micélio de *Pythium oligandrum*, os quais foram utilizados no tratamento de plantas de tomate, proporcionando um aumento na produção de etileno e uma significativa redução na murcha bacteriana (HASE et al., 2006). Outros elicitores em *P. oligandrum*, como a oligandrina, de aproximadamente 10 kDa e que induziu resistência em tomateiro contra *Phytophthora parasitica* (PICARD et al., 2000) ou duas frações protéicas de aproximadamente 24 e 27 kDa que induziram resistência em beterraba contra *Rhizoctonia solani* AG2-2 (TAKENAKA; NISHIO; NAKAMURA, 2003), já foram identificadas. Outro elicitador protéico é a harpina, que é sintetizada por bactérias como *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae*, tendo 44 kDa, rica em glicina, estável ao calor e capaz de elicitar reação de hipersensibilidade quando purificada e infiltrada nos espaços intercelulares de folhas de fumo (BARNY, 1995; WEI et al., 1992).

Portanto, extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* possuem tanto substâncias antibióticas como substâncias capazes de agir como elicitores de repostas de resistência em algumas plantas (local e sistemicamente), mostrando assim potencial para o uso no controle alternativo de

patógenos de plantas. Além disso, estudos com substâncias purificadas estão sendo conduzidos para se identificar os componentes responsáveis pelo efeito protetor e elucidar com precisão o mecanismo de ação (EIRA et al., 2005).

Apesar do uso de cultivares resistentes de tomateiro ser considerado o método mais efetivo para o controle destas doenças, inclusive com a identificação de fontes de resistência, existem evidências indicando que a resistência ao agente da murcha bacteriana não é estável, considerando-se diferentes localidades (HANSON *et al.*, 1996). Portanto, a indução de resistência torna-se bastante interessante, como componente de um manejo integrado, somando-se, por exemplo, ao emprego de cultivares menos suscetíveis ou tolerantes a *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

3.3 Considerações Finais

O extrato aquoso de basidiocarpos do isolado Le-96/17 de *Lentinula edodes* demonstrou potencial para diminuir a ocorrência de folhas murchas em tomateiro, causada por *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Além disso, aumentou a atividade da enzima peroxidase nos dois patossistemas estudados e a atividade de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase no patossistema tomate/*Clavibacter*, sugerindo assim a ocorrência de indução de resistência nas plantas. Comportamento semelhante foi apresentado pelo indutor acibenzolar-S-metil, que também reduziu a ocorrência de folhas murchas e causou aumentos nas atividades das enzimas. O efeito indutor de resistência é reforçado pelo fato de não ter ocorrido ação direta dos indutores sobre os patógenos *in vitro*.

A precipitação com sulfato de amônio do extrato aquoso de Le-96/17, seguida pela cromatografia de troca aniônica do precipitado 40-80%, permitiram verificar a presença de mais de uma banda nas frações 3 e 4, no precipitado 40-80% e no extrato aquoso de Le-96/17. O gel de poliacrilamida desnaturante mostra bandas com tamanhos aproximados de 29 e 37 kDa na fração 3 e de 45 kDa na fração 4.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952 p.

ANFOKA, G.; BUCHENAUER, H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 2, p. 85-101, 1997.

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. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2003. v. 11, p. 107-131.

ARAÚJO, J.S.P.; GONÇALVES, K.S.; OLIVEIRA, B.C.; RIBEIRO, R.L.D.; POLIDORO, J.C. Efeito do acibenzolar-S-metil sobre murcha-bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 5-8, 2005.

AVERRE, C. W.; KELMAN, A. Severity of bacterial wilt as influenced by ratio of virulent to avirulent cells of *Pseudomonas solanacearum* in inoculum. **Phytopathology**, Lancaster, v. 54, p. 779-783, 1964.

BARNY, M.A. *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reaction on tobacco. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 333-340, 1995.

BATISTA, M.F.; GUEDES, A.L.C. **Problemas fitopatológicos da cultura do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1981. 4 p. (CNPq. Comunicado Técnico, 21).

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**, London, v. 52, p. 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. (Ed.). **Indução de Resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 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**, San Diego, v. 72, p. 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**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 81, p. 1276-1281, 1991.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002.

CORDIER, C.; POZO, M.J.; BAREA, J.M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 11, n. 10, p. 1017-1028, 1998.

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

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeitos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* na proteção de plantas de maracujá contra o vírus do endurecimento dos frutos (PWV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, 2002.

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.

DIAS, S.C.; TAKATSU, A. Fístula bacteriana do pimentão (*Capsicum annum*) causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 10, 1989.

DRISTIG, M.C.G.; DIANESE, J.C. Uso de um conjunto de quatro bandas de proteínas de membranas de *Pseudomonas solanacearum* eluídas de gel de poliacrilamida, como antígeno na sorotipagem da bactéria. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 47, 1991.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 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**, New York, v. 7, p. 281-299, 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Tomate. In: _____. **Agriannual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 473-482.

GARTEMANN, K.H.; KIRCHNER, O.; ENGEMANN, J.; GRÄFEN, I.; EICHENLAUB, R.; BURGER, A. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 106, p. 179-191, 2003.

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.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Inducing resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**, Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. Chap.8, p. 177-199.

HANSON, P.M.; WANG, J.F.; LICARDO, O.; HANUDIN, MAH SY; HARTMAN G.L.; LIN, Y.C.; CHEN, T.J. Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. **Hortscience**, St. Joseph, v. 21, n. 1, p. 143-146, 1996.

HASE, S.; SHIMIZU, A.; NAKAHO, K.; TAKENAKA, S.; TAKAHASHI, H. Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. **Plant Pathology**, London, v. 55, p. 537-543, 2006.

HAYWARD, A.C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARDS, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 123-135

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.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 315–319, 2000.

ISHIKAWA, N.K. **Atividade antibacteriana em *Lentinula edodes***. 1998. 33 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

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.

JI, C.; KUC, J. Non-host resistance to *Colletotrichum lagenarium* in pumpkin and squash is not primarily associated with β -1,3-glucanase and chitinase activities. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 6, p. 361-370, 1997.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Lancaster, v. 44, p. 693-695, 1954

KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 12-24, 2005.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.; (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo:Ceres, 1997. v.2: Doenças das plantas cultivadas, 774 p.

KIMURA, O.; CARMO, M.G.F. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 66-70, 1995.

KOMEMUSHI, S.; YAMAMOTO, Y.; FUJITA, T. Antimicrobial substance produced by *Lentinula edodes*. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 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**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 21-25, 1996.

KRONKA, A.Z. **Cancro bacteriano do tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle**. 2004. 79 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KUROZAWA, C. Cancro bacteriano do tomateiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 50, p. 105-113, 1984.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2: Doenças das plantas cultivadas, p. 607-626.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LI, L.; STEFFENS, J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 239-247, 2002.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JÜLICH, W.D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 285-299, 2005.

LOPES, C.A. Doenças bacterianas da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 7, p. 40-42, 1981.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. Evidence of the stability of the resistance of the potato cultivar Achat to bacterial wilt in Brazil. **Bacterial Wilt Newsletter**, Melbourne, v. 11, p. 6-7, 1994.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 70 p.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p. 56-60, 1999.

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.

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.

MAFFIA, L.A.; MARTINS, M.C.P.; MATSUOKA, K. Doenças do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 66, n. 6, p. 42-60, 1980.

MAKI, C.S. **Respostas fungistáticas de *Lentinula edodes* sobre *Candida albicans* e análise da variabilidade intraespecífica**. 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

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

NIRANJAN RAJ, S.; SAROSH, B.R.; SHETTY, H.S. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 33, p. 563-571, 2006.

PACCOLA, E.A.S.; MAKI, C.S.; NOBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 176-178, 2001.

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**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 20-23, 1999.

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.141-199.

PICARD, K.; PONCHET, M.; BLEIN, J.P.; REY, P.; TIRILLY, Y.; BENHAMOU, N. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 379-395, 2000.

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. 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake growers handbook: The art and science of mushroom cultivation**. Dubuque, Hunt Publishing, 1990. 217 p.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995. 283 p.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, n. 10, p. 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**, São Paulo, v. 32, p. 52-55, 2001.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzymes activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 291-304, 1994.

SEQUEIRA, L.; HILL, I. M. Resistance in tobacco leaves: The growth of *P. solanacearum* in protected tissues. **Phytopathology**, Lancaster, v. 64, p. 447-455, 1974

SILVA, L.H.C.P. **Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro**. 2002. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, p. 295-295, 2001.

SOARES, R.M., MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 373-377, 2004.

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.

STADNIK, M.J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 175-177, 2000.

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

SUGANO, N.; HIBINO, Y.; CHOJI, Y.; MAEDA, H. Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol insoluble fractions from culture medium of *Lentinula edodes* mycelia. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 17, p. 109-114, 1982.

SUGUI, M.M.; ALVES DE LIMA, P.L.; DELMANTO, R.D.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 41, p. 555-560, 2003.

TAKENAKA, S.; NISHIO, Z.; NAKAMURA, Y. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1228-1232, 2003.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 673-676, 1995.

UMESHA, 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.

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.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Ya.; AMAZONAS, M.A.L.A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murril. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 4, p. 267-290, 2002.

WEI, Z.M.; LABY, R.J.; ZUMOFF, C.H.; BAEUR, D.W.; HE, S.Y.; COLLMER, A.; BEER, S.V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, Washington, v. 257, p. 85-88, 1992.

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, p. 197-205, 1990.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; YAO, C.; WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 391-396, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)