

## **Efeito antifúngico e indutor de fitoalexinas induzidos pelo extrato de *Lentinula edodes***

### **Antifungal and phytoalexin-inducing effect induced by *Lentinula edodes* extract**

Tainara Menegassi<sup>1</sup>, Marcos Vinícius Horst<sup>1</sup>, Eduard Duhatschek<sup>1</sup>, Leandro Alvarenga dos Santos<sup>1</sup>, Cacilda Márcia Duarte Rios Faria<sup>1</sup>, Carla Garcia<sup>1</sup>, Aline José Maia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) – Rua Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, 838 – CEP 85040-167 – Bairro Vila Carli, Guarapuava, Pr

\* Autor para Correspondência

### **RESUMO**

*Lentinula edodes*, apresenta em sua composição substâncias com ação antimicrobiana e de indução de resistência de plantas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato de *Lentinula edodes* no crescimento micelial de *Alternaria* sp., controle da mancha preta do tomate e na indução de fitoalexinas em feijão, soja e sorgo. Os tratamentos utilizados foram: extrato de *L. edodes* nas doses de 9; 18 e 36 g L<sup>-1</sup>, calda bordalesa (CB) e acibenzolar-S-metil (ASM). O extrato de *L. edodes* reduziu o crescimento micelial de *Alternaria* sp., promoveu o controle da mancha preta em tomate e não induziu a produção de fitoalexinas em feijão, soja e sorgo.

**Palavras-chave:** controle alternativo, shiitake, *Solanum lycopersicum*

### **ABSTRACT**

*Lentinula edodes* has in its composition a substance with antimicrobial action and plant resistance induction. Objective: Evaluate the effect of *Lentinula edodes* extract on the mycelial growth of *Alternaria* sp., tomato black spot control and on the induction of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum. The treatments used were: extract of *L. edodes* at doses of 9; 18 and 36 g L<sup>-1</sup>, bordeaux mixture (BM) and acibenzolar-S-methyl (ASM). The extract of *L. edodes* reduced the mycelial growth of *Alternaria* sp., promoted the control of black spot in tomato and did not induce the production of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum.

**Keywords:** alternative control, shiitake, *Solanum lycopersicum*

## INTRODUÇÃO

A espécie de basidiomiceto, *Lentinula edodes* (Shiitake), usado comumente como fungo comestível, shiitake, é nativo do leste da Ásia (PAUL et al., 2020). As hifas desse cogumelo sintetizam compostos antimicrobianos como 6-desoxieritronolídeo B, tanicolídeo, hidroxiantraquinona, benzilidenoacetona e 9-OxooTrE (TANG et al., 2020). Também podem ser encontrados compostos fenólicos, polissacarídeos, lectinas e lentiana que atuam de forma negativa ao desenvolvimento de patógenos (GAITÁN-HERNÁNDEZ et al., 2019). Esses compostos podem desencadear efeito de inibição no DNA, vazamento de proteínas e a destruição da permeabilidade da membrana celular do microrganismo, apresentando atividade antifúngica (ERDOĞAN e ELIF, 2021; ISHIHARA et al., 2018).

Extratos de *L. edodes* podem conter compostos que exercem como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que desencadeiam respostas de defesa em plantas. Podendo assim induzir a resistência de plantas contra patógenos (AGUIAR et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019).

Patógenos como *Alternaria brassicola*, que ocasiona mancha preta em repolho, *Alternaria tritica* (ferrugem da folha em trigo) apresentam sensibilidade aos compostos antimicrobianos de *L. edodes* (KUMARI et al., 2019; OSAKI-OKA et al., 2018). Esse efeito está relacionado à inibição do alongamento do tubo germinativo dos conídios devido à presença de escatol, ácido butírico, dodecalactona e guaiacol (FUJITA et al., 2021).

Folhas de arroz tratadas com compostos extraídos de *L. edodes* apresentaram indução de respostas de defesa como fitoalexinas (ISHIHARA et al., 2019). Em plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) o extrato desse cogumelo controlou a mancha de Phytophthora, esse processo foi possível devido à indução de resistência sistêmica adquirida, acúmulo de genes de resistências e aumento no conteúdo de ácido salicílico nessas plantas (KANG et al., 2017).

Dessa forma o objetivo desse trabalho é verificar o efeito do extrato de *L. edodes* no controle direto in vitro de *Alternaria* sp., da pinta preta do tomateiro e na indução das fitoalexinas faseolina (feijão), gliceolina (soja) e dioxiantocianidina (sorgo).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os basidiocarpos de *L. edodes* obtidos comercialmente foram secos a 40°C em estufa com circulação de ar até obter peso constante e moídos em moinho Marconi MA 048. O pó obtido foi hidratado na proporção de 14 mL de água destilada para um grama de basidiocarpo seco, durante 24 h à 4 °C, então filtrado em papel filtro para a obtenção do extrato bruto que foi diluído em água destilada nas diferentes concentrações 9; 18 e 36 g L<sup>-1</sup>. O isolado de *Alternaria* sp., obtido a partir de folhas de tomate, foram isolados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata, ágar e dextrose) e as placas foram incubadas a 25 °C e foto período de 12 horas. As colônias puras com sete dias foram utilizadas na inoculação das plantas de tomate.

Com essas doses desse extrato verificou-se o crescimento micelial de *Alternaria* sp., o controle da pinta preta do tomateiro e a indução de fitoalexinas faseolina (feijão), gliceolina (soja) e dioxiantocianidina (sorgo).

Crescimento micelial: o delineamento experimental foi casualizado, com cinco repetições, (uma placa de Petri), os tratamentos utilizados foram: meio BDA (batata, dextrose e ágar) (testemunha), ((sulfato de cobre: cal virgem: água) e doses do extrato de *L. edodes* (9; 18 e 36 g L<sup>-1</sup>), foram vertidos em placas de Petri, após receber discos de micélio (1 cm de diâmetro) de *Alternaria* sp. as placas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo 12 h. O crescimento micelial do patógeno foi mensurado quando a testemunha tomou completamente as dimensões da placa.

Controle de pinta preta em tomateiro: O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições (uma planta). As plantas de tomate cultivar Santa clara foram plantadas em vasos de 5 L contendo como substrato areia e solo na proporção 2:1, sendo uma planta por vaso. Estas plantas permaneceram em estufa com temperatura média de 25°C ±1 e umidade relativa de 75%. Os tratamentos foram: doses de do extrato de *L. edodes* (0; 9; 18 e 36 g L<sup>-1</sup>) e calda bordalesa (CB) (1:1:100) aplicados em plantas de tomate. As plantas apresentavam a primeira folha composto quando iniciou as aplicações, que foram realizadas no intervalo de sete dias, perfazendo um total de 4 aplicações. A pulverização foi com pulverizador manual com capacidade de 1000 mL. Na segunda aplicação, as plantas foram inoculadas com a suspensão de 1x10<sup>-4</sup> esporos mL<sup>-1</sup> de *Alternaria* sp. Com o aparecimento dos primeiros sintomas, as avaliações de severidade da doença foram realizadas por cinco semanas atribuindo-se notas a todos os folíolos das plantas, utilizando escala diagramática (AZAVEDO, 1998), para determinar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), baseado na fórmula: AACPD =  $\sum (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i)$ , na qual: n = número de avaliações; y = severidade da doença (%); t = tempo (dias) (CAMPBELL e MADDEN, 1990).

Fitoalexinas: o delineamento experimental foi casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos utilizados em casa de vegetação foram as doses do extrato, calda bordalesa (1:1:100) (CB) e acibenzolar-Smetil (ASM) (0,05 g L<sup>-1</sup>) (Bion®) foram utilizados na determinação da fitoalexina em hipocótilos de feijão, Faseolina, fitoalexina em cotilédones da soja, Gliceolina a fitoalexina em mesocótilos do sorgo, Deoxiantocianidina. A determinação da faseolina foi realizada conforme a metodologia proposta por Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijão carioca foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem a 120°C por uma hora e mantidas em câmara climatizada a 24°C em escuro por sete dias. Após esse período, foram cortados 5 cm dos segmentos de hipocótilos estiolados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo (aproximadamente 1g) foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre os hipocótilos, foram pulverizados os tratamentos. As placas de Petri foram mantidas a 25°C em escuro por 48 horas. Após esse período os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de etanol, sendo estes mantidos a 4°C por 48 horas para a extração da fitoalexina formada, sendo então agitados por uma hora. O teor de faseolina formada foi medida em espectrofotômetro a 280 nm. Álcool a 0,1% foi utilizado como testemunha. Para a determinação de gliceolina, sementes de soja foram desinfestadas, ficando imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 3:1 (3 partes de água: 1 parte de hipoclorito) por 2 minutos, finalizando com diversas lavagens em água destilada. Para posterior cultivo, areia foi autoclavada em autoclave a 120 atm por 1 hora, para total assepsia da mesma. Disposta em

bandejas de plástico onde, com o auxílio de uma caneta foram feitos buracos em seqüência, para a colocação das sementes que, após serem semeadas foram cobertas com areia. As bandejas permaneceram no Laboratório de Fitopatologia, em temperatura ambiente (25° C), sendo regadas com água destilada. Após o período de 12 dias, os cotilédones foram destacados e dispostos em placas de Petri (cinco cotilédones/placa), contendo um disco de papel Germitest umedecido com 2 mL de água destilada/autoclavada. Com o auxílio de um bisturi, foi realizado um corte na superfície adaxial de cada cotilédone, onde se adicionou 20µL das soluções de cada tratamento, totalizando 425 cotilédones utilizados. Com o auxílio de papel alumínio as placas foram totalmente cobertas, incubadas em BOD a 25° C por 20 horas. Após este período, os cotilédones foram pesados (peso/placa) e transferidos para frascos contendo 10 mL de água destilada/autoclavada, agitados em seguida por 1 hora em um Shaker (160 rpm) para a extração da fitoalexina. Após a retirada dos cotilédones, foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a uma absorbância de 285 nm (STANGARLIN et al., 2010), utilizando como branco a água destilada/autoclavada.

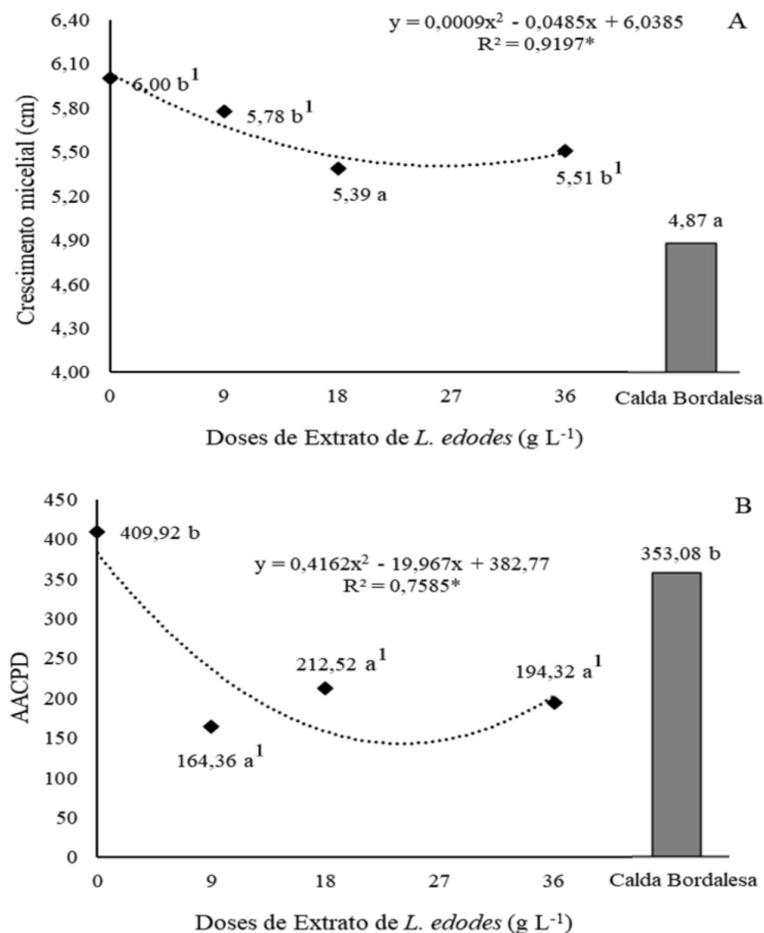
O bioensaio de fitoalexinas em sorgo foi realizado conforme descrito por Wulff (1997). Sementes de sorgo foram desinfetadas em hipoclorito de sódio 1% (15 minutos), lavadas em água destilada e embebidas em água sob temperatura ambiente por 6 horas. Após este período foram enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas em escuro a 28 °C por 4 dias. As plântulas formadas foram expostas a luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos. No teste de produção de fitoalexinas, os mesocótilos foram excisados 0,5cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de ensaio (1,2 x 10 cm; sendo 3mesocótilos por tubo/repetição e 5 repetições por tratamento), contendo os tratamentos. Estes tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25 °C sob luz fluorescente por um período de 60 horas (WULFF, 1997). Após esse período, os mesocótilos foram retirados dos tubos, secos e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5 cm) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocadas em tubos para microcentrífuga contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v v-1). Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4 °C no metanol por 96 horas para extração dos pigmentos. A fitoalexina induzida nos mesocótilos de sorgo foi a deoxiantocianidina e a absorbância foi determinada a 480 nm.

Para a análise dos dados utilizou-se o teste de Dunnett a 5% de probabilidade e análise de regressão por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o crescimento micelial indicam que houve efeito quadrático em função das doses do extrato de *L. edodes*, entretanto, a calda bordalesa apresentou menor crescimento micelial (Fig. 1 A). Para a área abaixo da curva de progresso de pinta preta em tomateiro houve efeito quadrático em função das concentrações do extrato de *L. edodes*, as quais diferiram do tratamento testemunha e calda bordalesa. A redução na severidade da doença foi de 60%, 48 % e 52% nas concentrações de 9, 18 e 36 g L<sup>-1</sup> do extrato de *L. edodes*, respectivamente (Fig. 1B).

**Figura 1.** Crescimento micelial (cm) de *Alternaria* sp. (A) e Área da curva de progresso da mancha preta no tomate (B). \* Significativo a 5% de probabilidade; As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre os testes de Dunnett quando comparados ao controle calda bordalesa.



As análises de fitoalexinas com as plantas indicadoras como o feijão, a soja e o sorgo não apresentaram diferença estatísticas entre os tratamentos (Tabela 1).

A redução do crescimento micelial de *Alternaria* sp., provavelmente ocorreu pela presença de compostos polifenólicos no extrato de *L. edodes*. Compostos que pode apresentar toxicidade a fitopatógenos, como por exemplo, o ácido clorogênico, que quando acumulado em tecidos vegetais, pode induzir a lise das células fúngicas de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* e *Cercosporiose sojina* (MARTÍNEZ et al., 2017; TANG et al., 2020).

A presença de  $\beta$  1,3 glucanos (exopolissacarídeos) no extrato de *L. edodes* pode ser verificado pela planta como um sinal de perigo, uma vez que é um importante componente da parede celular de fungos fitopatogênico, provavelmente a planta reconheceu um padrão molecular microbiano (PAMPS) (AGUIAR et al., 2020; FESEL e ZUCCARO, 2016), ativando seu mecanismo de defesa o que pode ter reduzido a severidade da pinta preta em tomateiro na presente pesquisa.

**Tabela 1.** Concentração de fitoalexinas em hipocótilos de feijão (Faseolina), cotilédones de soja (Gliceolina) e mesocótilos de sorgo (Deoxiantocianidina), tratados com extrato de *Lentinula edodes* (0, 9, 18 e 36 g L<sup>-1</sup>) calda bordalesa (CB) e acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion®).

Tratamentos	Faseolina (Abs <sub>280</sub> )	Gliceolina (Abs <sub>285</sub> )	Deoxiantocianidina (Abs <sub>480</sub> )
0 g L <sup>-1</sup>	0,84 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>
9 g L <sup>-1</sup>	0,81	0,08	0,27
18 g L <sup>-1</sup>	0,91	0,12	0,22
36 g L <sup>-1</sup>	1,07	0,10	0,29
CB	0,68	0,05	0,18
ASM	0,98	0,07	0,28
CV (%)	14,04	36,31	20,7

ns: não significativo

Considerando que a estrutura microfibrilar dos  $\beta$  1,3 glucanos (exopolissacarídeos) têm um papel na arquitetura e resistência da parede celular (RUIZ-HERRERA e ORTIZ-CASTELLANOS, 2019), possivelmente estes formem uma barreira química (substâncias tóxicas, compostos fenólicos) ou mecânica por meio da alteração da parede superior e adjacente das células epidérmicas do hospedeiro em função da deposição de caloses ( $\beta$  1,3 glucanos), lignina, derivados fenólicos, suberinas e silício, formando halos e papilas impedindo a penetração do patógeno na planta hospedeira (PASCHOLATE e DALIO, 2018). O que pode explicar a redução da severidade da pinta preta em tomateiro, uma vez que não houve estímulo na produção de fitoalexinas nas plantas indicadoras como o feijão, a soja e o sorgo, na presente pesquisa.

Porém extratos aquosos de *L. edodes* nas concentrações de 1, 2, 4 e 10% induziram o acúmulo de glicoseolina em soja (ARRUDA et al., 2012). Portanto ao analisar a Faseolina, Glicoseolina e a Deoxiantocianidina como indicadores de ativação de resistência (SOLINO et al., 2017), verificamos que a dose e a forma de extração de *L. edodes* interfere nesses mecanismos.

## CONCLUSÕES

O extrato de *L. edodes* apresenta efeito direto sobre o crescimento micelial de *Alternaria* sp., reduz a severidade da pinta preta do tomateiro e não induz fitoalexinas.

## REFERENCIAS

- AGUIAR, T.; SCHIMIDT, E. C.; DA ROCHA NETO, A. C.; DI PIERO, R. M. Physiological and histological aspects of innate and shiitake-induced resistance against bacterial spot on tomatoes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 3, p. 453-463, 2020.
- ARRUDA, R. S.; MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**.v. 28, n.2, p. 164-172, 2012.
- AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. 1 ed. São Paulo: Novartis, 1997. 114pp.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. **John and Wiley and Sons. Inc.**, New York, USA, p. 246-248, 1990.
- DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAWTON, M. A.; LAMB, C. J. Phytoalexin induction in French bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.71, n. 2, p. 251-256, 1983.
- ERDOĞAN ELIUZ, E. A. Antibacterial activity and antibacterial mechanism of ethanol extracts of *Lentinula edodes* (Shiitake) and *Agaricus bisporus* (button mushroom). **International Journal of Environmental Health Research**, v.1, n.14, 2021.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** v. 36, p.1039-1042, 2011.
- FESEL, A., P.; ZUCCARO, H.  $\beta$ -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p.53 – 60, 2016.
- FUJITA, R.; YOKONO, M.; UBE, N.; OKUDA, Y.; USHIJIMA, S.; FUKUSHIMA-SAKUNO, E.; ISHIHARA, A. Suppression of *Alternaria brassicicola* infection by volatile compounds from spent mushroom substrates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.132, n.1, p.25-32, 2021.
- GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ-PEÑA, D.; ESQUEDA, M.; GUTIÉRREZ, A. Review of bioactive molecules production, biomass, and basidiomata of shiitake culinary-medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 21, n. 9, p. 841-850, 2019.
- HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. **Plant Physiology**, v. 62, n. 1, p. 107–111, 1978.
- ISHIHARA, A.; ANDO, K.; YOSHIOKA, A.; MURATA, K.; KOKUBO, Y.; MORIMOTO, N.; OSAKI-OKA, K.. Induction of defense responses by extracts of spent mushroom substrates in rice. **Journal of pesticide science**, p. D18-063, 2019.

ISHIHARA, A.; GOTO, N.; KIKKAWA, M.; UBE, N.; USHIJIMA, S.; UENO, M.; OSAKI-OKA, K. Identification of antifungal compounds in the spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. **Journal of pesticide science**, v. 43, n. 2, p. 108-113, 2018.

KANG, D. S. et al. Defense response and suppression of phytophthora blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. **The plant pathology journal**, v.33, n. 3, p 264, 2017.

KUMARI, P.; CHOUDHARY, S. K.; KUMAR, A. In-vitro study of antifungal activity of *Lentinus edodes* mushroom extract against *Alternaria triticina*. **Biotechnology and Biological Sciences**, p. 392-395, 2019.

MARTÍNEZ, G.; REGENTE, M.; JACOBI, S.; DEL RIO, M.; PINEDO, M.; DE LA CANAL, L. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.140, p. 30-35, 2017

NICHOLSON, R. L.; JAMIL, F. F.; SNYDER, B. A.; LUE, W. L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 271-278, 1988.

OLIVEIRA, A. C.; MENEGASSI, T.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; GARCIA, C. Extrato de *Lentinula edodes* no controle e na indução de resistência a patógenos do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v.14, n.4, p.6900, 2019.

OSAKI-OKA, K.; KODANI, T.; ISHIHARA, A. Suppression of *Alternaria* sooty spot of cabbage by volatile compounds from spent substrates of shiitake (*Lentinula edodes*) and bunashimeji (*Hypsizygus marmoreus*). **Mushroom Sci Biotechnol**, v.26, p. 28-31, 2018.

PASCHOLATE, S.F; DALIO, R.J.D. **Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos**. In: Manual de fitopatologia, ed: L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho, 5ed, Ouro fino, MG: Agronômica Ceres, p.424-450, 2018.

PAUL, T.; PAL, S.; ROY, D.; SIKDAR, S. R.; MALLICK, P. Amplification and sequence analysis of 'nad1' gene from edible mushroom *Lentinula edodes*. **International Journal of Advancement in Life Sciences Research**, v. 3, n. 1, p. 32-36, 2020.

RUIZ-HERRERA, R.; ORTIZ-CASTELLANOS, L. Cell wall glucans of fungi. A review. **The Cell Surface**, v. 5, p 100022, 2019.

SOLINO, A. J. D. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; OLIVEIRA, J. S. B.; RIBEIRO, L.; SAAB, M. F. Accumulation of Phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates, **Revista Caatinga**, v.30, n.4, p. 1073-1078, 2017.

TANG, L.; SHANG, J.; SONG, C.; YANG, R.; SHANG, X.; MAO, W.; TAN, Q. Untargeted metabolite profiling of antimicrobial compounds in the brown film of *Lentinula edodes* mycelium via LC-MS/MS Analysis. **ACS omega**, v.5, n.13, p. 7567-7575. 2020.

