



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

MYCHELI PREUSS DA CRUZ

***Ganoderma lucidum* INDUZ RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATE CONTRA
Septoria lycopersici.**

Florianópolis
2024

MYCHELI PREUSS DA CRUZ

***Ganoderma lucidum* INDUZ RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATE CONTRA
Septoria lycopersici.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, área de concentração de Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Preuss da Cruz , Mycheli
Ganoderma lucidum induz resistência em plantas de
tomate contra Septoria lycopersici
Mycheli Preuss da Cruz ;orientador, Robson Marcelo Di
Piero, coorientador, Sérgio Miguel Mazaro , 2024.
70 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2024.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Ganoderma lucidum .
3. mancha de septoria no tomateiro . 4. manejo de doenças.
5. cultivo submerso . I. Marcelo Di Piero, Robson . II.
Miguel Mazaro , Sérgio . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. IV. Título.

MYCHELI PREUSS DA CRUZ

***Ganoderma lucidum* INDUZ RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATE CONTRA
Septoria lycopersici.**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 07 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Wagner Bettioli, Dr.
Embrapa Meio Ambiente

Dr^a Eliane Gonçalves da Silva
Coordenadora Pesquisa Ballagro Agro Tecnologia.

Prof. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina.

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Robson Marcelo Di Piero, Dr.
Orientador.

Florianópolis, 2024.

Aos meus queridos pais e irmã pelo apoio em todos os momentos, e para meus avós Alda Avila da Cruz e Bruno Duran da Cruz (in memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do doutorado;

Ao professor Dr. Robson Marcelo Di Piero pelos seus ensinamentos, orientação, confiança e incentivo o longo de todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr.Sérgio Miguel Mazaro pelos ensinamentos, coorientação, suporte e incentivo durante toda a minha caminhada acadêmica e profissional;

Ao Dr. Ricardo Filipini pelos ensinamentos, suporte e incentivo;

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC pela colaboração, amizade e convivência;

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos-UFSC pela dedicação e riquíssimos ensinamentos em aula.

Aos meus pais Ayrton Avila e Janice Preuss, que nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos, agradeço a compreensão e o incentivo ao longo da minha vida.

A minha irmã Martyna Preuss da Cruz, pelo apoio e amizade sincera.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos, o meu muito obrigada!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

RESUMO

A mancha foliar de *Septoria*, causada por *Septoria lycopersici*, é uma doença destrutiva em tomateiro. Atualmente, a principal forma de controle é o uso de fungicidas convencionais e cultivares resistentes. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade de filtrados de crescimento micelial (FM) e do extrato micelial (EM) de *Ganoderma lucidum* no controle da mancha foliar de septoria em casa de vegetação e estudar os modos de ação. Para obter compostos bioativos, inicialmente, dez discos miceliais (0.5 cm Ø) de *G. lucidum* foram transferidos para Erlenmeyers contendo 200 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD). Esses frascos foram incubados em mesa de agitação (120 rpm) a 26 ± 2 °C, no escuro, por 10 dias. A seguir, ácido salicílico (AS) a 2 mM ou extrato de *Trichoderma harzianum* (TH) a 5% (v/v) foram adicionados à cultura submersa, e os frascos incubados por mais 5 dias. Em seguida, foi realizada a filtração (Whatman no.41), obtendo filtrado de crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (FM). O micélio fúngico do crescimento em meio líquido BD foi coletado, lavado e ressuspensão em água destilada estéril (ADE) para obter uma concentração de 100 mg/mL, posteriormente, foi realizada autoclavagem por 20 min a 90°C, obtendo-se o extrato do micélio fúngico (EM). Plantas de tomate foram pulverizadas com ADE ou BD, ECM, FM, FM-AS ou FM-TH, todos na concentração de 40% (v/v), ou com um produto comercial a base de Azoxistrobina e Difenconazol a 50 ppm. Após 48 horas, as plantas foram inoculadas com 1×10^5 conídios. mL⁻¹ de *S. lycopersici* e mantidas em câmara úmida por 24 horas. A avaliação da severidade foi realizada na 3ª e 4ª folhas de cada planta. A quantificação da germinação de esporos foi realizada em segmentos foliares às 24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno, em microscopia de fluorescência. Para as análises bioquímicas, foram coletadas folhas de cada planta, antes do tratamento (tempo 0), e às 48, 72, 96 e 168 horas após o tratamento. Observou-se que a pulverização dos EM e dos FM no tomateiro reduziu a severidade da doença e a germinação do fungo em 90% e 60 %, respectivamente. O metabolismo associado à defesa do tomate foi significativamente modificado nas plantas tratadas, por meio das atividades das enzimas de defesa relacionadas ao metabolismo antioxidante, como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) catalase (CAT), peroxidase (POD), e os níveis de malondialdeído e peróxido de hidrogênio foram reduzidos, conseqüentemente houve uma ativação expressiva nos compostos fenólicos. Pode se concluir que os compostos bioativos de *G. lucidum* presentes no FM e no EM ativaram mecanismos de defesa vegetal, reduziram o dano oxidativo provocado por *Septoria* em tomate e promoveram o controle da doença.

Palavras-chave: *Septoria lycopersici*; *Ganoderma lucidum*; elicitores; controle biológico; indução resistência; controle doenças

ABSTRACT

Septoria leaf spot, caused by *Septoria lycopersici*, is a destructive disease on tomato. Currently, the main form of control is the use of conventional fungicides and resistant cultivars. Thus, this research aimed to evaluate the ability of *Ganoderma lucidum* mycelial growth filtrates (FM) and mycelial extract (EM) to control the disease in a greenhouse and to study the mode of action. To obtain bioactive compounds, initially, ten mycelial discs (0.5 cm Ø) from *G. lucidum* were transferred to Erlenmeyer flasks containing 200 mL of potato-dextrose (BD) culture medium. These flasks were incubated on a shaking table (120 rpm) at 26 ± 2 °C, in the dark, for 10 days. After that, 2 mM salicylic acid (SA) or 5% (v/v) *Trichoderma harzianum* extract (TH) were added to the submerged culture, and incubated for another 5 days. Then, filtration was performed (Whatman no.41), obtaining *Ganoderma lucidum* mycelial growth filtrate (FM). The fungal mycelium from growth in BD liquid medium was collected, washed and resuspended in sterile distilled water (ADE) to obtain a concentration of 100 mg/mL, subsequently autoclaved for 20 min at 90°C, obtaining the mycelium extract fungus (EM). Tomato plants were sprayed with ADE or BD, EM, FM, FM-AS or FM-TH, all at a concentration of 40% (v/v), or with a commercial product based on Azoxystrobin and Difenoconazole at 50 ppm. After 48 hours, the plants were inoculated with 1×10^5 conidia. mL⁻¹ of *S. lycopersici* and kept in a humid chamber for 24 hours. Severity assessment was carried out on the 3rd and 4th leaves of each plant. Quantification of spore germination was carried out in leaf segments at 24, 48 and 72 hours after pathogen inoculation, using fluorescence microscopy. For biochemical analyses, leaves were collected from each plant, before treatment (time 0), and at 48, 72, 96 and 168 hours after treatment. It was observed that the spraying of EM and FM on tomato reduced the severity of the disease and the germination of the fungus by 90% and 60%, respectively. The metabolism associated with tomato defense was significantly modified in treated plants, through the activities of defense enzymes related to antioxidant metabolism, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) catalase (CAT), peroxidase (POD), and the levels of malondialdehyde and hydrogen peroxide were reduced, consequently there was a significant activation in phenolic compounds. It can be concluded that the bioactive compounds of *G. lucidum* present in FM and EM activated plant defense mechanisms, reduced the oxidative damage caused by *Septoria* in tomato and promoted disease control.

Keywords: *Septoria lycopersici*; *Ganoderma lucidum*; elicitors; biological control; induced resistance; disease control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sintomas da Septoriose em tomateiros cultivados a campo-----	22
Figura 2 –Planta de tomate inoculada com <i>Septoria lycopersici</i> (A), lesão com formação de picnídios (B), picnídios liberando cirros de conídios (C-D) -----	23
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Septoria lycopersici</i> em tomateiro-----	24
Figura 4 - Fotografias de <i>Ganoderma lucidum</i> . Corpos de frutificação (A); micélio (B); e esporos (C) -----	26
Figura 5 – Cultivo submerso de <i>Ganoderma lucidum</i> -----	29
Figura 6 - Representação esquemática da co-evolução entre plantas e patógenos. Modelo “zigue-zague” com as etapas do desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante a infecção-----	33
Figura 7 - Hipótese de “guarda” para sinalização do gene R durante a defesa vegetal a patógenos-----	35
Figura 8 - Principais efeitos do FM e EM no patossistema tomate- <i>Septoria lycopersici</i> -----	45
Figura 9 - Severidade e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) da mancha de septoria em plantas de tomate em função da aplicação do filtrado de crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> , FM; fungicida a base de Azoxistrobina, Difenconazol ou água destilada. Valores representam médias de três avaliações ± desvio padrão da média. -----	53
Figura 10 - Severidade da mancha de septoria (A), densidade de picnídios (B) e colonização (C) nas terceiras folhas de tomateiro pré - aspergidas com água (controle) ou FM (40% v/v) e avaliados aos 21 após a inoculação com <i>Septoria lycopersici</i> ----	55
Figura 11- Efeito do filtrado de crescimento micelial de <i>Ganoderma lucidum</i> (FM) sobre <i>Septoria lycopersici</i> pelo método do caldo de microdiluição . Em (A), foto da microplaca ilustrando os resultados. Em (B), o crescimento do patógeno avaliado através da absorbância a 405 nm, em diferentes diluições-----	56
Figura 12- Figura 12. Efeito das frações polar e apolar de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre <i>Septoria lycopersici</i> pelo método do caldo de microdiluição . Em (A), foto da microplaca ilustrando os resultados. Em (B), o crescimento do patógeno avaliado através da absorbância a 405 nm, em diferentes diluições-----	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da aplicação foliar e irrigação radicular com FCM, sobre a severidade da mancha de septoria em tomateiro -----	54
Tabela 2 - Efeito local ou sistêmico da aplicação foliar com FCM, sobre a severidade da mancha de septoria em tomateiro-----	54
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima in vitro de filtrado e frações de <i>G. lucidum</i> sobre esporos de <i>S. lycopersici</i> pelo método do caldo de microdiluição-----	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Água destilada estéril
ANO	Análise de variância
AOS	Óxido de aleno sintase
APX	Ascorbato peroxidase
ASM	Acibenzolar-S-metil
BD	Batata-dextrose
BDA	Batata-dextrose-ágar
CAT	Catalase
EM	Extrato do crescimento micelial
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FM	Filtrado do crescimento micelial
MIC	Concentração inibitória mínima
POD	Peroxidase
EAO	Espécies reativas de oxigênio
AS	Ácido salicílico
SOD	Superóxido dismutase
TH	<i>Trichoderma harzianum</i>

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2.OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CULTURA DO TOMATE	20
2.2 MANCHA DE SEPTORIA.....	21
2.3 <i>Ganoderma lucidum</i> : FONTE IMPORTANTE DE COMPOSTOS	24
2.4 CULTIVO SUBMERSO DE <i>Ganoderma lucidum</i>	28
2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS	31
2.6 MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	32
3.CAPÍTULO 1– <i>Ganoderma lucidum</i> MYCELIAL GROWTH FILTRATE AND THE MYCELIAL EXTRACT INCREASE DEFENSE RESPONSES AGAINST SEPTORIA LEAF SPOT IN TOMATO.....	39
3.1 INTRODUÇÃO	40
3.2 METODOLOGIA.....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.4 CONCLUSÃO.....	45
4.CAPÍTULO 2- EFEITO SISTÊMICO DO FILTRADO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Ganoderma lucidum</i> SOBRE A SEPTORIOSE E NA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>Septoria lycopersici</i>	46
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 METODOLOGIA.....	49
4.2.1 Materiais biológicos	49
4.2.2 Efeito local e sistêmico do FM sobre a severidade da doença.....	50
4.2.3 Efeito na formação de picnídios e colonização estomática	51
4.2.4 Fracionamento e atividade antifúngica <i>in vitro</i>	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Comparação entre FM e fungicida tradicional para o controle da septoriose.....	53
5.2. Efeito sistêmico do FM sobre a septoriose.....	54
5.3 Efeito do filtrado micelial na formação de picnídios por <i>S. lycopersici</i>	55
5.4 Determinação da concentrada inibitória mínima	56
6.DISCUSSÃO	58
7.CONCLUSÃO.....	61
REFERENCIAS.....	70

1.INTRODUÇÃO

O fungo *Septoria lycopersici* Spegazzini causa a mancha de septoria no tomateiro é considerado um dos patógenos de relevância para a cultura, estando disseminado por todas as regiões produtoras de tomate do mundo. Quando medidas de controle não são tomadas, as perdas causadas pela desfolha podem alcançar 80%. Essa doença também foi relatada em outros hospedeiros pertencentes à família Solanaceae, como berinjela, jiló, batata e algumas plantas daninhas (Hastoy et al., 2019; Jones et al., 1991).

A mancha de septoria ocorre em todos os estágios de desenvolvimento do tomateiro. Os sintomas iniciais são observados nas folhas mais velhas, geralmente por ocasião da formação do primeiro cacho de frutos, por meio de numerosas manchas circulares a elípticas, de 2 a 3 mm de diâmetro, com as bordas escurecidas e o centro cor de palha. A infecção prolongada resulta na fusão de lesões levando ao amarelecimento das folhas e desfolha. O patógeno é caracterizado por picnídios marrom-escuros e conídios filiformes hialinos multicelulares (Kapooria, 1998).

O manejo da doença ainda é baseado na aplicação de fungicidas. Apesar de sua razoável eficácia, o uso de fungicidas tem sido uma preocupação crescente devido aos problemas ambientais, riscos à saúde humana e alto custo para o produtor (Baldicera *et al.*, 2020). Diante dos desafios para a produção desta cultura e da grande dificuldade de obtenção de um controle efetivo da mancha de septoria, decidiu-se estudar uma abordagem mais sustentável para combater a doença por meio da resistência induzida.

Estratégias utilizando bioestimulantes, biopesticidas, biofungicidas e indutores de resistência estão em ascensão para manejar doenças em plantas (Bettiol *et al.*, 2019). O mercado mundial de biopesticidas está projetado para crescer de US\$ 3,0 bilhões em 2018 para US\$ 6,4 bilhões até 2023, com expectativa de uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 15,9% durante o período analisado (Markets and Markets, 2020). Atualmente, inúmeros microrganismos são utilizados com eficiência como biofungicidas na agricultura, como *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. e *Paecilomyces* spp. Esses microrganismos atuam por meio da produção de metabólitos secundários com ação antibiótica e antifúngica, ou ainda agem ativando respostas de defesa vegetal (Köhl *et al.*, 2019).

O controle de doenças também pode ser obtido utilizando os mecanismos de defesa das plantas, após a aplicação de metabólitos de patógenos e vários outros compostos bióticos e abióticos denominados elicitores (Torres; Jones; Dangl, 2006; Walters et al., 2013). Além de desencadear a proteção contra patógenos de plantas, alguns elicitores também afetam as respostas fisiológicas nas plantas, resultando em aumento no rendimento e na qualidade da cultura por meio de melhor assimilação de nutrientes ou aumento da tolerância às baixas ou altas temperaturas e estresse hídrico (Chuang et al., 2014; Walters et al., 2013). A indução da resistência pode ser obtida pela aplicação exógena de fitormônios como ácido salicílico (AS), compostos artificiais como o acibenzolar-S-metil (ASM), padrões moleculares associados a patógenos ou microrganismos (PAMPs/MAMPs) e outros compostos incluindo nutrientes minerais, como fósforo, potássio e silício (Achuo et al., 2004; Torres; Jones; Dangl, 2006; Mesquita et al., 2019; Wiesel et al., 2014).

A proteção em plantas pode ser induzida pela aplicação exógena de fitormônios como ácido salicílico (AS), compostos artificiais como o acibenzolar-S-metil (ASM), padrões moleculares associados a patógenos ou microrganismos (PAMPs/MAMPs), e outros compostos incluindo nutrientes minerais, como fósforo, potássio e silício (Achuo et al., 2004; Torres; Jones; Dangl, 2006; Mesquita et al., 2019; Wiesel et al., 2014).

Nesse cenário destaca-se o potencial de *Ganoderma lucidum*, um basidiomiceto utilizado tradicionalmente por suas propriedades medicinais. O corpo de frutificação e o micélio deste cogumelo são compostos por polissacarídeos, triterpenos e mais de 200 metabólitos secundários são produzidos. Esse microrganismo também sintetiza antibióticos, substâncias ativadoras do sistema imunológico, antivirais, antialérgicos e outros compostos de interesse medicinal com ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica, usados principalmente na medicina humana e animal (Gu et al., 2018, Yang et al. 2022)

Alguns estudos demonstraram a ação dos compostos bioativos de *Ganoderma* spp. no controle de doenças de plantas. Conforme Yang et al. (2022), o polissacarídeo de *G. lucidum* (GLP) aumentou as taxas de germinação das sementes e as alturas de plântulas de milho e trigo, além de, quando associados a fungicidas químicos no tratamento de sementes, apresentarem efeito de controle de mais de 75% das doenças causadas por patógenos habitantes do solo em ensaios de casa de vegetação e de campo. Zhang et al. (2019) observaram que a pulverização foliar e a

irrigação das raízes com um polissacarídeo isolado de *G. lucidum* promoveu o crescimento de plantas de algodão e ativou os mecanismos de defesa que auxiliaram no controle do *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.). Jogaiah *et al.* (2016) isolaram um composto de *Ganoderma applanatum* (G_app7), com eficácia no controle de *Sclerospora graminicola* no milho. Sajeena e Marimuthu (2013) demonstraram que a aplicação foliar de uma formulação contendo *Ganoderma* sp. (Ganosol 10EC) reduziu o número de lesões causadas por *Rhizoctonia solani* em plantas de arroz.

A crescente demanda mundial por insumos menos tóxicos e alimentos livres de resíduos químicos justifica a busca por compostos biocompatíveis para o controle de doenças de plantas na agricultura. O cultivo de *G. lucidum* apresenta potencial de gerar moléculas bioativas com potencial de uso no controle de doenças de plantas diretamente ou por meio da ativação de mecanismo de defesa em plantas. Além disso, na literatura a ausência de trabalhos relacionados a indutores de resistência obtidos do cultivo em meio líquido e biomassas fúngicas de *G. lucidum* justifica a importância do presente estudo. objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do filtrado de crescimento micelial e do extrato micelial de *G. lucidum* para proteger plantas de tomate contra *S. lycopersici* e no metabolismo do tomateiro.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência dos filtrados e do extrato de *Ganoderma lucidum* no controle de *Septoria lycopersici* em tomate e determinar os modos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficiência dos filtrados e extrato de *G. lucidum* no controle de *S. lycopersici* no tomate;

Avaliar *in vitro* o efeito dos filtrados e extrato na germinação de conídios e no crescimento micelial de *S. lycopersici*;

Avaliar *in planta* o efeito dos filtrados e do extrato na germinação de conídios e crescimento epifítico de *S. lycopersici*, e na colonização das cavidades subestomáticas;

Determinar a ativação bioquímica dos mecanismos de defesa vegetal induzidos em plantas de tomate após o tratamento com os filtrados e o extrato contra *S. lycopersici*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO TOMATE

O tomate (*Solanum lycopersicum Linnaeus*), nativo da região andina da América do Sul, é uma das culturas hortícolas mais comuns e cultivadas em todo o mundo. Pertence à família Solanaceae e foi domesticado no México de onde foi difundido para o mundo. No Brasil foi introduzido por imigrantes no final do século XIX (Alvarenga, 2004)

O tomate é o segundo vegetal mais consumido no mundo depois da batata, sua produção global duplicou nos últimos 20 anos, devido ao crescimento do consumo pela população. A China vem sendo o maior produtor de tomate mundial, com produção de 50,7 milhões de toneladas, representando hoje em média 31% da produção mundial. China, Índia, Estados Unidos da América, Turquia, Egito, Irã, Itália e Brasil produzem 71% do total mundial dessa solanácea (Faostat, 2016).

Na América do Sul, o Brasil lidera a produção de tomate para processamento industrial, sendo o maior mercado consumidor de seus derivados industrializados. A safra brasileira em 2022 foi de 3.8 milhões toneladas com área total de produção de 54.502 mil hectares, com um rendimento médio de 69.905 Kg por hectare. A cultura do tomate tem relevância para o Brasil, tanto pela sua representação em área plantada quanto pela importância na dieta básica das pessoas (IBGE, 2022).

A tomaticultura está presente em todo o território brasileiro, principalmente na região Sudeste. Esta região corresponde especialmente à produção de tomates de mesa. A região Centro-Oeste produz basicamente tomates destinados à indústria. Os maiores produtores brasileiros de tomate para a indústria são Goiás com 32,4%, São Paulo com 21,1%, Minas Gerais com 16,7%, Bahia com 4,5% e Santa Catarina com 4,4% (IBGE, 2018).

Este fruto tem grande importância para o Brasil, tanto pela área plantada quanto pelo consumo na alimentação por grande parcela da população. As diversas formas de consumo do fruto, tanto na forma in natura, como na forma industrializada, propiciam ao tomate destaque no mercado. Conforme o sistema de cultivo, o tomate pode ser dividido em “estaqueado” ou “tutorado” e “rasteiro” ou “industrial”, de acordo com o seu hábito de crescimento (Moraes et al., 2011).

O ciclo do tomate é anual possuindo de quatro a sete meses de ciclo de vida, sendo que a colheita ocorre de 1 a 3 meses. A floração e frutificação ocorrem junto

com o crescimento vegetativo possuindo folhas pecioladas, compostas por número ímpar de folíolos (Filgueira, 2003). O seu fruto é classificado como climatérico e sua maturação é controlada por vários fatores fisiológicos e bioquímicos, que provocam variabilidade nas características de sabor, odor e textura. O tomate é considerado uma fonte importante de minerais, compostos antioxidantes e carotenóides, como o licopeno, β -caroteno e luteína, além de outros fitoquímicos, como tocoferóis, ácido ascórbico e polifenóis (Shirahige et al., 2010).

O plantio do tomate é recomendado considerando o local e a época do ano. Na região Sul do Brasil o plantio é indicado entre os meses de setembro e fevereiro, região Norte o plantio ocorre entre os meses de março a julho, regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste o plantio pode ser feito o ano todo. As cultivares de tomate destinadas ao consumo in natura podem ser divididas em quatro grupos: Cereja, Italiano, Salada e Santa Cruz (Pereira et al., 2013).

Embora tenha ocorrido aumento da produtividade de tomate nos últimos anos, vários fatores limitam sua produtividade, entre eles as pragas e doenças. As doenças vêm provocando muitos prejuízos aos agricultores, uma vez que esta cultura é suscetível a muitos fitopatógenos, que são os responsáveis pela maior perda de rendimento e deterioração da qualidade dos frutos (Pereira et al., 2013).

2.2 MANCHA DE SEPTORIA

A mancha foliar de septoria, causada por *Septoria lycopersici*, é uma das mais importantes doenças do tomateiro no Brasil. Apesar de sua importância, o agente causal ainda é pouco estudado. A doença causa desfolha das plantas, reduzindo a produtividade e a qualidade dos frutos. Inicialmente, os sintomas podem ser confundidos com os da pinta-preta, quando as lesões ainda não estão totalmente desenvolvidas. Essa doença provoca perdas devido à destruição progressiva da folhagem que, além de reduzir a área foliar responsável pela fotossíntese, ocasiona um impacto negativo na produção de frutos e os expõem à queimadura de sol. Em condições favoráveis ao patógeno a doença causa desfolha severa das plantas (Lopes et al., 2005; Pereira et al., 2013). No Brasil não existem cultivares ou híbridos comerciais de tomate com resistência à septoriose (Pereira et al., 2013).

Em levantamento realizado em cultivos rasteiros de tomate, destinado ao processamento industrial nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, a

septoriose estava presente em 23,5% das lavouras, sendo a doença fúngica de maior ocorrência. A doença torna-se limitante ao cultivo sob condições de chuvas constantes, o que ocorre no verão na maioria das regiões produtoras de tomate estaqueado (Quezado-Duval et al., 2013).

Os sintomas típicos desta doença são manchas circulares, com bordas escurecidas e centro cor de palha no qual podem ser visualizadas pontuações escuras. Em ataques severos as lesões coalescem, as folhas amarelecem, secam e caem (Figura 1) (Jones et al., 1991; Zambolim et al., 2000). Quando as lesões não estão totalmente desenvolvidas, a septoriose pode ser confundida com a mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) e pinta preta (*Alternaria solani*) (Reis et al., 2006).

Figura 1 - Sintomas da Septoriose em tomateiros cultivados a campo.



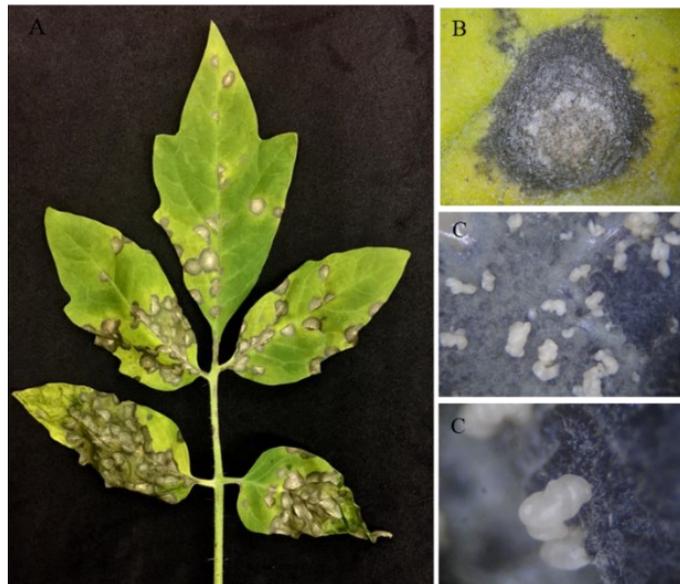
Fonte: Autor (2022).

O agente causal da mancha-de-septoria do tomateiro é *Septoria lycopersici* Speg, relatado pela primeira vez na Argentina, em 1882, por Spegazzini. Segundo Viégas (1962), a espécie *S. lycopersici* é um fungo imperfeito da classe dos coelomicetos, cujas estruturas reprodutivas assexuais se formam dentro de picnídios. Estes são globosos, subepidérmicos, ostiolados de paredes definidas. Os conidióforos são curtos com um conídio terminal. Os conídios são hialinos, longos, finos, multiseptados (1 a 12 septos – média de 6), são liberados dos picnídios em cirros hialinos, aglutinados entre si por uma substância mucilaginosa, os quais são dispersos em água e disseminado pelo impacto das gotas (Jones et al., 1991; Lopes et al., 2005).

Os picnídios são estruturas muito características desse patógeno, conforme pode ser observado na Figura 2. Ademais, eles são formados em folhas e caules doentes de tomate, também são produzidos em abundância em meios de cultura e

substratos vegetais esterilizados. O picnídio consiste em uma cavidade corpo globoso, sem ostíolo distinto. A parede dos picnídios se quebra facilmente, e picnidiósporos são liberados. Os picnídios têm entre 300 e 750 nm de diâmetro. Os picnídios produzidos na planta geralmente são muito menores, têm de 30 a 175 nm. Os picnidiósporos são produzidos em grandes números dentro do picnídio (Agrios, 2005).

Figura 2 – Planta de tomate inoculada com *Septoria lycopersici* (A), lesão com formação de picnídios (B), picnídios liberando cirros de conídios (C-D).

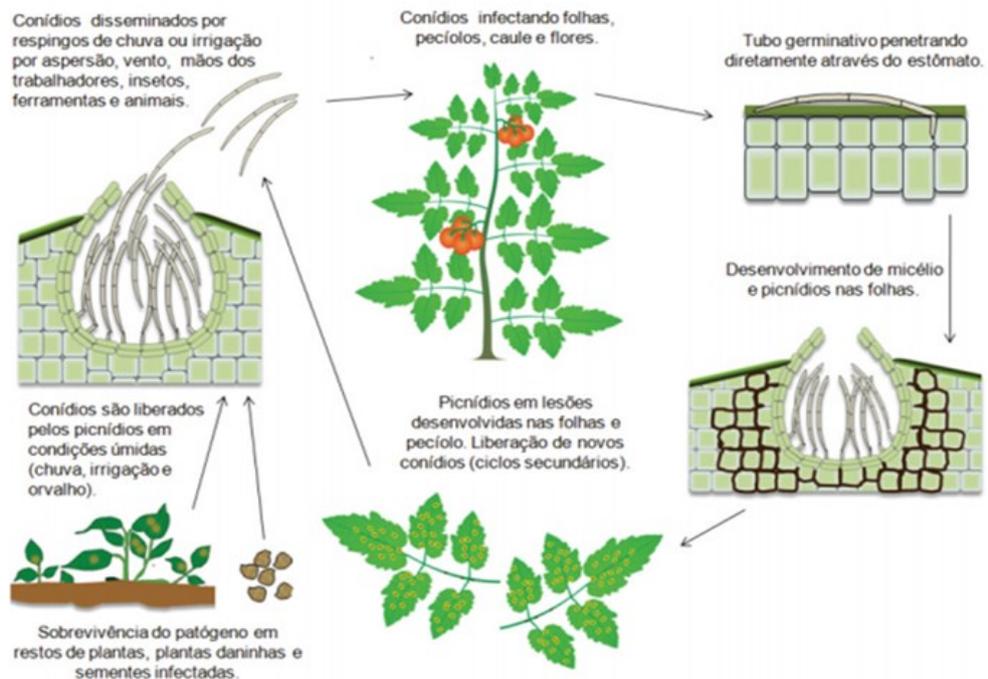


Fonte: Autor (2022).

A disseminação ocorre pelo impacto de gotas de água, seja da chuva ou de irrigação por aspersão, associadas a ventos fortes. A água é um fator importante para o ciclo da doença. Segundo Viegas (1962), a água desaglutina os conídios, mantidos em mucilagem, e contribui para a sua dispersão. Na superfície do hospedeiro, em condições de alta umidade relativa e temperaturas favoráveis (15°C a 27°C), os conídios germinam na presença de água livre na folha em aproximadamente 48 horas, penetram por meio dos estômatos ou ferimentos, seguida por uma fase necrotrófica. Após 6 a 10 dias desenvolvem-se as lesões. Os picnídios surgem após os 14 dias da infecção. Em condições de alta umidade, os conídios em cirros são liberados dos picnídios. Períodos prolongados de temperaturas entre 20°C e 25°C, acompanhados de chuvas e/ou orvalho, na presença de grandes quantidades de inóculo, são favoráveis ao progresso de epidemias da doença. Na Figura 3 é apresentado o ciclo

de vida de *Septoria lycopersici* em tomateiro (Kurozawa; Pavan, 2016; Pereira et al., 2013; Zambolim et al., 2000).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Septoria lycopersici* em tomateiro



Fonte: Adaptado de Pereira (2013).

Apesar dos esforços para descobrir fontes de resistência, não existem cultivares ou híbridos comerciais de tomate que apresentem bons níveis de resistência ao patógeno. O controle químico com fungicidas de cobre é uma estratégia usada para controlar as manchas foliares no tomate, mas os resultados são variáveis e há o risco de selecionar patógenos tolerantes/resistentes ao cobre. Dentre as alternativas sustentáveis para o manejo da doença são incluídas práticas orgânicas, manejo integrado, controle biológico, uso de híbridos resistentes e indução de resistência (Moura et al, 2020).

2.3 *Ganoderma lucidum*: FONTE IMPORTANTE DE COMPOSTOS

Os cogumelos fazem parte do filo basidiomycota, que apresenta cerca de 30.000 espécies, possuem micélio septado e se reproduzem por esporos exógenos (basidiósporos) formados sobre uma hifa especial denominada basídio. São

conhecidos desde os primórdios da humanidade, seja por sua toxidez, seja por suas propriedades nutracêuticas (nutricionais e medicinais) (Moore-Landecker, 1972).

Ganoderma lucidum é um cogumelo lenhoso não comestível, nativo das partes orientais da Ásia, incluindo China, Japão e Coreia. Na cultura japonesa, onde é reverenciado e considerado o mais importante de todos os fungos medicinais, é conhecido como Reishi (Nahata, 2013). Na China, sua denominação comum é de Lingzhi, significando Ling - “divino” - e zhi - “força da vida”. As crenças orientais antigas acreditavam que seu corpo de frutificação trazia longevidade, devido ao seu misterioso poder de curar o corpo e acalmar a mente, além de ser altamente valorizado por suas propriedades medicinais (Moore-Landecker, 1972). O seu corpo de frutificação e micélio possuem uma abundância de componentes bioativos. No Brasil, figuram os termos de Cogumelo Rei, do Imperador e Brillhante, este último devido à origem grega da palavra ganoderma: ganos - “brilho” - e derma “pele” (Urben, 2004).

O uso popular deste cogumelo incentivou pesquisas em relação às atividades antitumorais e imunomoduladoras. Destacam-se também sua ação antialérgica, hipotensiva, hipoglicêmica, antibacteriana e antioxidante, também utilizado para enfermidades como hepatite, hipertensão, diabetes, úlceras e câncer gástrico (Urben, 2017).

Apresenta ciclo reprodutivo característico, com formação de corpo de frutificação, esporos, hifas e micélio (Figura 4). O desenvolvimento do basidiocarpo é geralmente anual e pode levar de 3 a 6 meses, dependendo da linhagem, substrato de cultivo e fatores bióticos e abióticos (Urben et al., 2017). O corpo de frutificação apresenta formato de rim, com margens finas, geralmente curvadas para dentro e superfície rugosa com aparência envernizada, apresentando-se amarelada quando jovem e escurecendo para cor marrom avermelhada e, posteriormente, para um marrom escuro conforme amadurece (Figura 4-A). O seu micélio é denso, filamentososo, com aspecto radiado, de coloração branca quando jovem e amarelada a marrom quando adulto (Figura 4-B). A parede da hifa do micélio é constituída de camadas de polissacarídeos, que são macromoléculas compostas por açúcares simples existentes no citoplasma das células, como celulose e glucana (Urben et al., 2017; Wasser; Weis, 1999). Seus esporos são marrons e ovóides. (Figura 4-C) (Urben et al., 2017; Wasser; Weis, 1999).

Figura 4 - Fotografias de *Ganoderma lucidum*.
Corpos de frutificação (A); micélio (B); e esporos (C).



Fonte: Adaptado de (A) Petersen (1982); (B) o autor (2022); (C) Vermaas (2003).

Nas modernas investigações farmacológicas são relatados registros de mais de 240 compostos secundários, que incluem na sua maioria polissacarídeos, triterpenóides, proteínas, peptídeos, adenosina e nucleotídeos (Cheng et al., 2012; Gu et al., 2018).

Os principais metabólitos secundários isolados de *Ganoderma* sp. pertencem a vários grupos, incluindo ácidos ganodéricos, aldeídos, álcoois, ésteres, glicosídeos, lactonas, cetonas de lanostanos C30, ácidos lucidênicos, lactonas, ésteres de lanostanos C27, C24, lanostanos, triterpenos pentacíclicos C27, meroterpenóides, hidroquinonas farnesil (meroterpenóides), sesquiterpenóides C15, esteróides, alcalóides, prenil hidroquinona, benzofuranos, derivados de benzopirano-4-ona e derivados de benzenóides (Boh et al., 2007).

Os principais polissacarídeos isolados, β -1-3 e β -1-6 D-glucanas, formam em torno de 46% da massa da parede celular. As proteínas bioativas são relatadas por contribuírem para as propriedades medicinais, incluindo Ling Zhi-8, uma proteína imunossupressora purificada do micélio (Van Der Hem et al., 1995); e uma proteína antifúngica chamada ganodermina, isolada dos corpos frutíferos (Wang; Ng, 2006).

Os ácidos ganodéricos são triterpenos que possuem atividade farmacológica comprovada, tais como atividade antioxidante, antitumoral, antiviral, hepatoprotetora, hipocolesterolêmica, entre outras. Mais de 50 triterpenos exclusivos do *G. lucidum* denominados ácidos ganodéricos e lucidênicos já foram identificados (Yuen; Gohel, 2005).

Vários peptídeos bioativos também foram isolados de *G. lucidum*, incluindo: o proteoglicano GLPG (*Ganoderma lucidum* proteoglycan) com atividade antiviral (Li,

Liu, Zhao, 2005); a substância imunomoduladora chamada de GLIS (Ji et al., 2007). PGY, um glicopeptídeo fracionada e purificada a partir de extratos aquosos do corpo de frutificação (Wu; Wang, 2009).

Óleos voláteis também foram relatados em espécies de *Ganoderma*, óleo volátil isolado dos corpos de frutificação por hidrodestilação e caracterizado por cromatografia gasosa GC-FID (detector por ionização em chamas) e GC-MS (espectro de massas). Dos 65 constituintes identificados no óleo essencial, os principais foram trans-anetol (9,1%), r - (-) - linalol (4,4%), s - (+) - carvona (4,4%), 2-pentilfurano (2,8%), α -terpineol (2,7%) e n-nonanal (2,3%) (Ziegenbein et al., 2006).

Dentre esses metabólitos secundários produzidos pelo *G.lucidum* na fase micelial, Satria et al. (2019) encontraram 42 metabólitos que apresentam relevância. O crisofanol tem sido relatado como um inibidor altamente ativo de fungos patogênicos em plantas, pela supressão do crescimento micelial (Choi et al., 2004). Da mesma forma, o ergosterol, um esterol que pode ser encontrado apenas em fungos, foi relatado por ter a capacidade de ativar a enzima de defesa em plantas contra fungos patogênicos (Shao et al., 2010). Vários triterpenóides do tipo lanostano, como ácido ganodérico C6, ácido ganodérico H e outros metabólitos não identificados foram produzidos em quantidades mais altas na fase micelial (Satria et al., 2019). Esses fatos mostram que existe uma forte correlação entre os metabólitos secundários e sua atividade biológica.

Existem poucas publicações sobre a atividade antifúngica de *G. lucidum*. Wang e Ng (2006) isolaram com sucesso a chamada proteína antifúngica ganodermina, que inibe o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Physalospora piricola*. Os extratos metanólico e aquoso foram examinados contra *Penicillium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Mucor indicus*. Foi observada forte atividade contra *Mucor indicus* (Sridhar et al., 2011). No estudo de Heleno et al. (2013), um extrato de *G. lucidum* excedeu a atividade antifúngica contra *Trichoderma viride*, em comparação com a atividade de padrões conhecidos, ou seja, bifonazol e cetoconazol.

Porém, estudos já demonstram seu potencial antibacteriano inibindo o crescimento e em alguns casos matando bactérias patogênicas (Gao et al., 2003). Skalicka-Woźniak et al. (2012) estudaram a atividade antibacteriana dos polissacarídeos de *G. lucidum in vitro* pelo método de microdiluição em caldo (CIM). Todas as amostras de polissacarídeo testadas mostraram amplo espectro e atividade

antibacteriana moderada. A cepa de *Micrococcus luteus* foi a mais sensível com CIM de 0,63 - 1,25 mg / mL.

Sajeena e Marimuthu (2013) testaram uma formulação isolada de *Ganoderma* sp. (Ganosol 10EC a 0,25%), esse extrato foi eficaz, inibindo o crescimento micelial da requeima da bainha em plantas de arroz, causada por *Rhizoctonia solani*. A aplicação com pré-inoculação da formulação reduziu 63,62% na quantidade de lesão causada pelo patógeno. Um composto chamado de G_app7, que foi isolado de *Ganoderma applanatum*, apresentou atividade anti-oomiceta semelhante à estrobilurina. Esse composto foi eficiente na inibição do crescimento e desenvolvimento do míldio causados por *Sclerospora graminicola* em milho (Pennisetum glaucum (L.) R. Br.) (Jogaiah *et al.*, 2016).

Kamble, Venkata e Gupte (2011) estudaram atividade antimicrobiana dos extratos obtidos do micélio de *G. lucidum* secos que foram extraídos em diferentes solventes como metanol, acetona, clorofórmio e água destilada, separadamente. Esses extratos foram testados para o controle de organismos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium difteria*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas* sp. Os quatro extratos na concentração de 100 mg/ml apresentaram inibição dos microrganismos. Em outro estudo, os polissacarídeos de *G. lucidum* foram extraídos com água fervente, e apresentaram efeito inibitório sobre *Erwinia carotovora*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* (Bai *et al.*, 2008).

2.4 CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma lucidum*

O cultivo submerso é o processo de cultivo de microrganismos em meio líquido. Essa forma de cultivo atrai a atenção de pesquisadores que trabalham com bioprospecção de substâncias bioativas. O cultivo submerso de *G. lucidum* tem recebido grande interesse nos países asiáticos como uma alternativa promissora para a produção eficiente de seus metabólitos, polissacarídeos e ácido ganodérico (Wang *et al.*, 2014).

O cultivo submerso oferece diversas vantagens, principalmente devido ao controle mais preciso de fatores importantes, como temperatura, densidade e morfologia do inóculo, pH, pressão osmótica, taxa de agitação e de aeração (Wang *et al.*, 2014). Esses fatores controlados contribuem para um crescimento mais rápido e

eficiente das culturas. Através deste método, é possível extrair substâncias de interesse, como os endopolissacarídeos (IPS) a partir da biomassa micelial, e os exopolissacarídeos (EPS) isolados do caldo de cultivo. Essas biomoléculas são de grande interesse farmacológico devido às suas potenciais propriedades terapêuticas (Wan et al., 2016). Essa forma de cultivo pode ser realizada em frascos estáticos e sob agitação, em frascos pequenos ou ainda biorreatores. Estudos preliminares utilizam frascos pequenos, com intuito de avaliar melhor as condições de cultivo para um futuro processo industrial (Fang; Tang; Zhong, 2002).

No estado de cultivo submersos de *G. lucidum*, a biomassa suspensa cresce como um aglomerado de micélios que eventualmente se estabilizam para formar pellets na forma de hifas densamente ramificadas, formando uma forma ovóide compacta (Espinosa et al., 2021). Esse mesmo crescimento foi observado no cultivo realizado neste estudo, conforme Figura 5.

Figura 5. Cultivo submerso de *Ganoderma lucidum*



Fonte: Autor (2022).

Várias pesquisas foram realizadas para elevar a produção de compostos bioativos de fungos em meio líquido através de fatores como suprimento de oxigênio, variação de nutrientes e utilizando a engenharia genética e elicitores. Os elicitores são compostos que estimulam a defesa do organismo e podem desempenhar papéis importantes no aumento da via biossintética para a produção melhorada de compostos bioativos secundários comercialmente importantes. Por vezes, tornam o processo mais rápido e eficiente, levando à produção de substâncias de interesse (Tang; Zhong, 2003; Xu; Xu; Zhong, 2012).

Shi et al. (2010) observaram correlação positiva entre a adição de eliciadores no cultivo submerso e o acúmulo de compostos bioativos e pesquisas são conduzidas para explicar como tais sinais induzem a biossintéticos da ácido ganodérico por *G. lucidum*. Uma das formas de eliciação é a utilização de microrganismos competidores, vistos como um fator biológico capaz de estimular a produção de enzimas com potencial bioativo.

Zhu, Zhong e Tang (2008), a fim de melhorar a produção e a produtividade de metabólitos bioativos, testaram diferentes elicitores fúngicos no cultivo submersa de *G. lucidum*, para identificar o elicitor ótimo. Testaram três maneiras de preparar bioelicitores de três diferentes componentes isolados do micélio fúngico. Os melhores resultados foram obtidos com o uso dos fungos *Tubersinense*, *Tubera estivum vittad* e *Tubermelanosporum*, que reduziram o crescimento micelial de *G. lucidum*, no entanto, aumentou a produção de EPS, IPS e do ácido ganodérico.

Outros compostos também são testados, o ácido salicílico (AS), um tipo de ácido fenólico com papel essencial nos sistemas de defesa das plantas, é admitido por induzir resistência adquirida sistemicamente a muitos patógenos e também pode induzir a biossíntese de metabólitos secundários em fungos. Em um primeiro estudo, realizado por Cao et al. (2017), a adição de AS em meio líquido promoveu o acúmulo de metabólitos secundários por *G. lucidum*, sendo um destes o ácido ganoderico. Estes autores citam que o uso do AS pode fornecer um método conveniente, novo e adequado para melhorar o acúmulo de substâncias bioativas de fungos, através da alteração e ativação de rotas metabólicas.

Também Liu et al. (2018) demonstraram que o tratamento com AS aumentou a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) através de diferentes vias em *G. lucidum*. Por um lado, o AS induz uma explosão oxidativa de ROS através do complexo NADPH-oxidase (NOX), que são enzimas transmembranas que estão localizadas em organelas intracelulares. Por outro lado, o AS inibe a atividade do complexo da mitocôndria III e esse efeito desempenha um papel importante na diminuição da frequência respiratória. Os autores descobriram que a diminuição na taxa respiratória mitocondrial induzida por AS ajuda a regular o acúmulo de ROS. Em resumo, em *G. lucidum* o AS inibe a atividade do complexo III para aumentar os níveis de ROS, os quais estão envolvidos na regulação da biossíntese de ácido ganodérico. Esse fenômeno interessante indica que os hormônios vegetais podem induzir a biossíntese de metabólitos secundários em fungos. No entanto, o mecanismo pelo

qual o AS regula o metabolismo secundário de *G. lucidum* ainda permanece incerto (Liu et al., 2018). A eliciação de fungos em cultivo submersa é uma abordagem moderna e eficiente, e que necessita ainda muita investigação e estudo, mas pode vir a contribuir para extração de substâncias com potencial no controle de patógenos de interesse agrônômico.

2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

As plantas são organismos sésseis, frequentemente expostos a milhares de microrganismos, incluindo patogênicos e benéficos, o que levou ao desenvolvimento de complexos mecanismos de defesa (Agrios, 2005). De forma geral, as plantas possuem mecanismos físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos (Agrios, 2005). Além disso, as plantas possuem mecanismos pré-existentes que são ativados após o reconhecimento do patógeno, levando à formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Agrios, 2005).

A habilidade das plantas se defenderem contra infecção por patógenos está intimamente relacionada com a sua capacidade de detectá-los (Agrios, 2005). As plantas possuem capacidade de detectar e reconhecer potenciais microrganismos invasores e de ativar respostas de defesa (Pandey et al., 2017). Ao contrário, para perceber os microrganismos benéficos e formar uma relação simbiótica com eles, as plantas adotam receptores de superfície celular semelhantes, mas distintos (Zipfel; Oldroyd, 2017). As plantas podem reconhecer os microrganismos benéficos reconhecendo os compostos microbianos comuns que produzem, como flagelina, lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos e oligossacarídeos de quitina, como ligantes (Zipfel; Oldroyd, 2017)

A partir da percepção de moléculas sinalizadoras, conhecidas como elicitores, geralmente iniciam com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese do ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno (Cluzet et al., 2004). Em termos gerais, a resistência induzida pode ser basicamente dividida em duas categorias: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). A SAR pode ser induzida por uma variedade de agentes, incluindo produtos químicos, como por exemplo, acibenzolar-S-metil, e são caracterizados pelo acúmulo

de PR-proteínas e normalmente mediada por uma via dependente do ácido salicílico (Walters et al., 2013). Já o segundo tipo de resistência, a ISR, ocorre sistemicamente geralmente em resposta à colonização das raízes de plantas por certas bactérias promotoras de crescimento sendo mediada pela via do ácido jasmônico e/ou etileno (Walters et al., 2013).

O tratamento de plantas com vários agentes, incluindo fragmentos de parede celular, extratos de plantas e produtos químicos sintéticos, pode induzir resistência ao subsequente ataque de patógenos local e sistemicamente. Em última análise, a resistência induzida resulta em uma redução significativa no tamanho e/ou número de lesões causadas por patógenos, oferecendo uma abordagem eficaz e sustentável para o controle de doenças em plantas cultivadas (Walters; Fountaine, 2009).

2.6 MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A longa história de associações planta-patógeno levou à evolução de múltiplos mecanismos de resistência na planta. As plantas são equipadas para detectar assinaturas moleculares microbianas conservadas evolutivamente, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), e ativam respostas imunes. Os elicitores endógenos são igualmente reconhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Boller; Félix, 2009; Jone; Dangl, 2006).

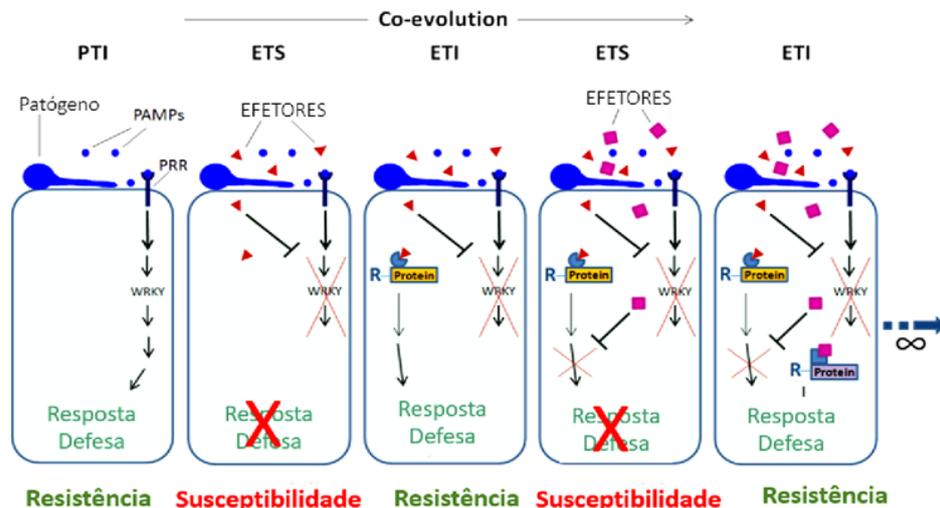
De acordo com estudo proposto por Jone e Dangl (2006), as plantas possuem o sistema de defesa constituído por duas linhas de defesa, sendo a primeira linha PTI (PTI – “PAMP-Triggered Immunity”) ativada por PAMPs (Padrões moleculares associados à patógenos) e a segunda ETI (ETI – Effector-Triggered Immunity) desencadeada por efetores.

Ou seja, a maioria dos mecanismos de defesa das plantas é ativada em resposta à infecção pelo patógeno. Quando um microrganismo entra em contato com a planta para infectá-la, ele encontra uma primeira barreira que corresponde aos mecanismos de resistência a não-hospedeiro. Ocorre o reconhecimento direto através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como quitina e glucanas em fungos, flagelina e fator de alongação Tu em bactérias, os quais são reconhecidos pela planta através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Este reconhecimento resulta em uma cascata de sinalização, geralmente através de fatores

de transcrição WRKY que levam à imunidade desencadeada por PAMP (PTI). O patógeno pode vencer essa barreira de duas formas: evitando o reconhecimento de seu PAMP através de mutação ou secretando efetores que minam o sistema de defesa (“effector triggered susceptibility-ETS), resultando em suscetibilidade desencadeada por efetor. Por sua vez, as plantas adquiriram resistência (R): proteínas que reconhecem efetores, tornando o patógeno avirulento (avr), são selecionadas e a resistência é restabelecida (“effector triggered immunity” -ETI).

No entanto, um novo ciclo se inicia, pois, a pressão de seleção atuará agora na população do patógeno de modo a selecionar aqueles genótipos que produzem moléculas efectoras que não são reconhecidas pelo hospedeiro, resultando em nova suplantação da resistência (ETS). O ciclo se perpetua desse modo, como uma “corrida armamentista” (Jones; Dangl, 2006). Este processo pode ser repetido várias vezes, tendendo ao infinito.

Figura 6 - Representação esquemática da co-evolução entre plantas e patógenos. Modelo “zigue-zague” com as etapas do desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante a infecção



Fonte: Adaptado de Jones e Dangl (2006).

Ao contrário da PTI, que ocorre em todos os membros de uma determinada espécie de planta, a ETI acontece a nível intraespecífico, onde para cada gene efector do patógeno, há uma proteína de reconhecimento na planta. Flor (1971) hipotetizou o modo de ação da interação R-efetor e denominou-a de "hipótese gene a gene", esta hipótese explica como a resistência é desencadeada por interações entre o gene de resistência do hospedeiro e o gene da avirulência cognata do patógeno microbiano.

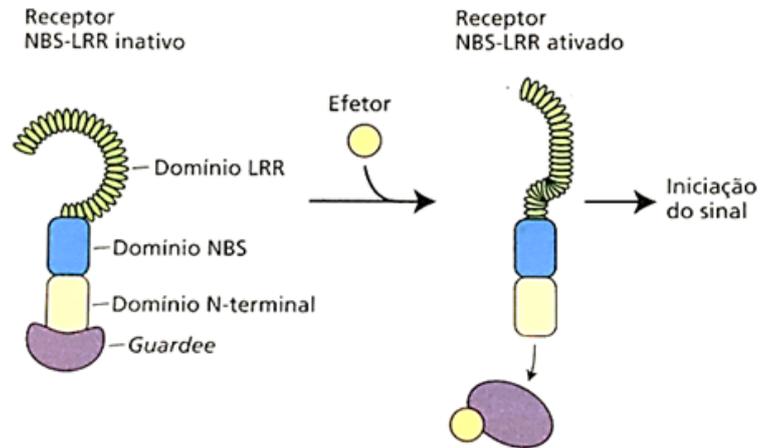
Ou seja, o processo é iniciado quando uma planta, contendo em seu genoma o gene dominante de resistência R, reconhece um patógeno com o gene dominante de avirulência Avr correspondente ao seu gene R, havendo uma reação compatível entre eles. Não havendo compatibilidade entre os genes R da planta e os Avr do patógeno, não há reconhecimento nem resistência e a doença se instala (Flor, 1971).

Os genes R são altamente polimórficos e possuem diversas especificidades de reconhecimento. Geralmente, ocorrem como parte de uma família de genes em “clusters” que evoluíram por duplicação e recombinação. Atualmente são conhecidos mais de 40 genes de resistência organizados basicamente em 5 classes. A grande maioria codifica proteínas contendo domínios de ligação a nucleotídeos (‘Nucleotide binding’, NB) e repetições ricas em leucina (‘Leucine-rich repeat’, LRR (Dang; Jones, 2001).

Foi demonstrado que somente os genes Pi-ta e Pto (*P. Syri ngae* pv. tomato) codificam proteínas que interagem diretamente com proteínas elicitoras produzidas pelo patógeno como proposto pelo modelo gene a gene (Flor, 1971). Em função disso, tem sido proposto que esta interação envolve uma proteína chamada ‘guardiã’ capaz de reconhecer mais de uma proteína AVR, e ao fazê-lo sofre uma mudança conformacional ativando a proteína R que, por sua vez, desencadeia a resposta de resistência (Van Der Biezen; Jones, 1998).

Muitos genes R reconhecem indiretamente efetores, isso é chamado de ‘hipótese da guarda’. De acordo com a hipótese-guarda, os produtos dos genes R “guardam” proteínas chamadas guardee. A interação entre as proteínas guardee e os efetores do patógeno é necessária para a infecção do patógeno. O receptor NBS-LRR permanece inativo enquanto estiver ligado à proteína guardee. Entretanto, quando o efetor interage com a proteína, alterando sua conformação ou modificando-a quimicamente, o receptor NBS-LRR é ativado, desencadeando a cascata de sinalização que leva a resposta de defesa (Głowacki et al., 2011). Assim, de acordo com a hipótese guarda, as proteínas R vão atuar monitorando a presença de proteínas efetoras ou de modificações de proteínas alvo no hospedeiro pelos efetores do patógeno.

Figura 7 - Hipótese de “guarda” para sinalização do gene R durante a defesa vegetal.



Fonte: Adaptado de Taiz, Zeiger, (2017).

Uma vez ocorrido o reconhecimento do patógeno invasor, ocorre a ativação de uma complexa rede de sinais mediada. A rota de resistência mediada pelo AS envolve a ativação de respostas de defesa no local da infecção e sistêmicas ('Systemic acquired resistance', SAR) (Ryals et al., 1996).

O AS pode ser produzido por duas rotas distintas. A primeira envolve a rota dos fenilpropanóides em que o AS é sintetizado a partir da fenilalanina. A segunda, responsável por grande parte do AS produzido, envolve a rota do chiquimato, em um processo em que participa a enzima isocorismato sintase 1 (ICS1) codificada pelo gene SID2 ('Salicylic acid induction deficient 2') (Wildermuth et al., 2001). O acúmulo do AS desencadeia a expressão de genes de duas vias de resposta de defesa, a primeira é constituída por genes expressos precocemente, cerca de 2-3h após a indução. Nessa resposta estão envolvidos os genes que codificam as enzimas glutationa-S-transferase e glicosiltransferases que protegem as células do estresse oxidativo. A segunda via envolve genes expressos cerca de 12-16h após a indução que são regulados pelo gene NPR1 ('Non-expressor of PR1'), também conhecido como NIM1 (Dong, 2004).

Após o reconhecimento do patógeno pela planta, uma das primeiras linhas de defesa da planta é chamada de “explosão oxidativa”, no qual há a formação pela planta das espécies ativas de oxigênio (EROs), compostos por ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de hidroxila livres (OH^-), que por reações

de oxidação geram o colapso das células localizadas na região de infecção, que pode resultar na morte da célula vegetal conhecida como “reação de hipersensibilidade”. Entre as etapas iniciais de formação de EROs em destaque está a atividade do complexo enzimático NADPH-oxidase presente na membrana plasmática, estas enzimas resultam da transferência de elétrons e formação do radical superóxido, o qual pode resultar na peroxidação lipídica ou ser transformado (catalizado) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A partir disso, o passo seguinte no metabolismo de EROs é a detoxificação do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima catalase (CAT), essa enzima irá transformar H_2O_2 em H_2O e O_2 . As peroxidases também podem estar atuando no processo de eliminação do H_2O_2 através da sua utilização como substrato para síntese de lignina ou outros compostos (Resende et al., 2003).

Embora a resposta de hipersensibilidade seja considerada uma das respostas de defesa mais importantes, outros mecanismos de defesa podem ocorrer sem que haja a “RH”, como acúmulo de fitoalexinas, aumento da rigidez da parede celular, síntese de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede fúngica e a síntese de proteínas relacionadas à patogenicidade (Heil; Bostock, 2002). Entre as respostas mais conhecidas na expressão da RSA, está a síntese de fitoalexinas e de proteínas-RPs, sendo que as fitoalexinas atuam localmente e as proteínas caracterizam-se pela ação local e sistêmica (Heil; Bostock, 2002).

As alterações metabólicas envolvidas com os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves do metabolismo primário e secundário. Entre estas está a enzima peroxidase, que participa também da biossíntese de etileno, oxidação de compostos fenólicos e estão relacionadas com respostas de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. Outra enzima intensamente estudada em plantas é a fenilalanina amônia-liase (FAL), situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A FAL é catalisadora da reação de desaminação da L-fenilalanina e gera ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em muitos compostos fenólicos que estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (Taiz; Zeiger, 2004).

Entre as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-PRs), as mais pesquisadas são as β -1,3-glucanases (PR-2) e as quitinases (PR-3), que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos, com atividade aumentada quando as plantas são tratadas com indutores de resistência (Labanca, 2002).

Entre os potenciais indutores de resistência encontram-se os cogumelos comestíveis e medicinais. Ainda são escassos estudos com compostos bioativos de *G. lucidum* no controle e prevenção de doenças em plantas. Até o momento, são mínimos os relatórios sobre o mecanismo pelo qual induz resistência a doenças.

Em trabalhos desenvolvidos com esta mesma cepa de *G. lucidum* que será utilizada neste estudo, os filtrados do cultivo em meio líquido ativaram a resistência de plantas de soja e reduziram a severidade a oídio (*Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu) (Cruz et al., 2019). A redução da doença pode estar relacionada à ativação de fitoalexinas, ativação da enzima fenilalanina amônia-liase, compostos fenólicos, peroxidases e atividade da quitinase, essa indução demonstrou especificidade em relação à ativação do tempo e associação com elicitores testados (Cruz et al., 2019).

Zhang et al., (2019) testaram o polissacarídeo de *Ganoderma lucidum* (GLP) seu mecanismo no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* no algodoeiro. Após o tratamento de plantas de algodão com o GLP, houve aumento da atividade de peroxidase, superóxido dismutase e polifenoloxidase nas folhas, enquanto o conteúdo do malondialdeído (MDA) diminuiu. Além disso, houve aumento significativo na expressão de genes relacionados à via do ácido jasmônico no algodão. Supondo que o GLP pode induzir resistências em plantas, estimulando a via do jasmonato.

Stadnik, Bettiol e Saito (2003) estudaram o efeito de extrato etanólico de *Ganoderma* sp. na indução de resistência de pepino (*Cucumis sativus* cv. Safira) cultivado em casa de vegetação contra oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). O extrato bruto reduziu o número de lesões na segunda folha em 79% e 65 %, respectivamente, comparado com a testemunha. Esses dados evidenciam que a indução de resistência sistêmica em plantas de pepino pode estar envolvida na redução da severidade da doença.

Os exemplos apresentados ilustram a escassez de pesquisas sobre o uso dos compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* no controle de doenças de plantas, apesar de seu grande potencial. Esses estudos destacam a importância de

investigações adicionais para explorar essa abordagem promissora. Os estudos planejados para este trabalho contribuirão para preencher essa lacuna de conhecimento e fornecerão novas experiências e descobertas significativas ao longo dos próximos anos. Espera-se que essa pesquisa amplie nossa compreensão sobre a eficácia e o mecanismo de ação desses compostos, abrindo novas oportunidades para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes no controle de doenças de plantas.

3.CAPÍTULO 1– GANODERMA *LUCIDUM* MYCELIAL GROWTH FILTRATE AND THE MYCELIAL EXTRACT INCREASE DEFENSE RESPONSES AGAINST SEPTORIA LEAF SPOT IN TOMATO¹

A aplicação foliar do filtrado de crescimento micelial de Ganoderma lucidum ou do extrato micelial reduziu em mais de 90% a severidade da mancha foliar de Septoria em tomateiro, e promoveu aumento nas atividades de enzimas relacionadas à defesa vegetal.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo examinar a capacidade de preparações obtidas do cogumelo *Ganoderma lucidum*, o filtrado de crescimento micelial (FM) e o extrato micelial (EM), de fornecer proteção e induzir resistência em tomateiro contra *Septoria lycopersici*. Em casa de vegetação, a aplicação foliar de FM e EM a 40 % (v/v) 2 dias antes da inoculação do fungo reduziu a severidade da doença e a germinação do fungo em 90% e 60 %, respectivamente. O metabolismo associado à defesa do tomate foi significativamente modificado nas plantas tratadas, os níveis de malondialdeído e peróxido de hidrogênio foram reduzidos, a atividade de enzimas antioxidantes foi aumentada (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase) e o metabolismo secundário da planta foi ativado através da enzima fenilalanina amônia-liase, o que resultou em um aumento expressivo nos compostos fenólicos. Portanto, os compostos presentes no FM e EM ativam os mecanismos de defesa, reduzem o dano oxidativo causado por *Septoria* em plantas de tomate e promovem o controle das doenças.

Palavras-chave: *Septoria lycopersici*; cogumelo; elicitores; controle biológico, resistência induzida, controle de doenças.

¹ Artigo publicado no periódico *Biological Control*. Volume 173, October 2022, 105002. doi: 10.1016/j.biocontrol.2022.105002.

3.1 INTRODUÇÃO

A mancha de septoria é uma das doenças relevantes na cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em todo o mundo, podendo levar a perdas de 100% na produção. Causada por *Septoria lycopersici* Speg, esta doença pode afetar outros hospedeiros pertencentes à família Solanaceae, como berinjela, berinjela escarlate e batata (Jones et al., 1991; Mattos et al., 2020). Não existe cultivar de tomateiro resistente a *S. lycopersici*, e o manejo da doença se baseia no controle químico com o uso de fungicidas convencionais (Ávila et al., 2020). Neste contexto, buscar alternativas complementares, como o uso de indutores de resistência é altamente encorajado.

Uma abordagem promissora é o uso de elicitores de defesa vegetal. Estes compreendem um amplo grupo de moléculas que podem desencadear respostas de defesa contra patógenos em um processo chamado de resistência induzida. A elicitação da defesa pode ser ativada pela aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM), um análogo sintético do ácido salicílico; por nutrientes minerais como fósforo, potássio e silício; ou por MAMPs, padrões moleculares associados a microrganismos, como quitina e flagelina, que são altamente conservados em classes inteiras de microrganismos (Boller; Félix, 2009; Jones; Dangl, 2006; Wiesel et al., 2014).

Cogumelos também podem ser fontes de elicitores *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. [Ling Zhi] é um dos cogumelos medicinais mais conhecidos e usados pela medicina tradicional nos países asiáticos há milhares de anos (Lu et al., 2020). Produz mais de 400 compostos bioativos, incluindo triterpenóides, polissacarídeos, aminoácidos, enzimas, antibióticos, substâncias ativadoras do sistema imunológico, antivirais, antialérgicos e outros compostos de interesse medicinal com ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica (Gu et al., 2018).

Devido às enormes perdas de colheitas em todo o mundo devido a fungos fitopatogénicos resistentes a pesticidas, há um aumento na procura de desenvolvimento de novas estratégias antifúngicas na agricultura. Extratos brutos e filtrados microbianos são considerados potenciais biofungicidas e agentes eficientes de controle de doenças. Estudos demonstraram *Ganoderma* spp. atividade na redução de doenças de plantas. De acordo com Zhang et al. (2019), a pulverização foliar e a irrigação radicular com um polissacarídeo isolado de *G. lucidum* promoveram o crescimento do algodoeiro e ativaram mecanismos de defesa que ajudaram no

controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Sangeetha et al. (2020) demonstraram atividade antiviral de filtrados de cultura de *G. lucidum* contra o vírus da necrose de botão de amendoim (GBNV) em tomate, reduzindo o número de lesões e inibindo o acúmulo de população de vírus após a pulverização. Sajeena e Marimuthu (2013) demonstraram que a aplicação foliar de *Ganoderma* sp. (Ganosol 10EC) reduziu o número de lesões causadas por *Rhizoctonia solani* em plantas de arroz. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do filtrado de crescimento micelial e do extrato micelial de *G. lucidum* para proteger plantas de tomate contra *S. lycopersici* e avaliar seu efeito no desenvolvimento do patógeno e no metabolismo do tomateiro.

3.2 METODOLOGIA

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst. (isolado CC339ST) foi obtido da empresa pública brasileira de pesquisa agropecuária Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil). Placas de Petri contendo batata-dextrose-água (BDA; Kasvi, Brasil) foram inoculadas com plugs de micélio CC339ST, incubadas por 7 dias a 28 ± 2 °C em um fotoperíodo de 12 h e armazenadas a 4 °C para uso posterior.

O processo de cultivo submerso foi iniciado com a adição de 10 discos de água (0,5 cm Ø) de culturas ativadas de *G. lucidum* a frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio batata-dextrose (BD®; Kasvi, Brasil), pH 5,1. Os frascos foram colocados em agitador rotativo, agitados a 120 rpm no escuro a 28 ± 2 °C por 20 dias. Para tratamentos específicos, 2 mM de ácido salicílico (SA) ou 5% (v/v) de suspensão de esporos inativados de *Trichoderma harzianum* (TH) foram adicionados 10 dias após a inoculação do frasco com discos de cultura. O micélio foi coletado de culturas líquidas, lavado em água deionizada estéril (AD), seco à temperatura ambiente e suspenso em AD estéril a 100 mg.mL⁻¹. Esta suspensão de micélio foi filtrada (Whatman no.41) e designada como extrato micelial (EM). Para a obtenção do filtrado de crescimento micelial (FM) de *G. lucidum*, o meio foi filtrado em papel de filtro Whatman n. 41. Foram obtidos FM de *G. lucidum* sem indução; FM induzido com TH (FM + TH); FM eliciado com SA (FM + SA); e extrato micelial (EM).

Plantas de tomate cultivadas em casa de vegetação foram pulverizadas com: (1) filtrado de crescimento micelial (FM), (2) filtrado de crescimento micelial induzido com *T. harzianum* (FM + TH), (3) filtrado de crescimento micelial induzido com ácido

salicílico (FM + SA) e, (4) extrato micelial (EM) todos na concentração de 40% (v/v). Água destilada (AD); meio líquido de batata-dextrose (BD); ácido salicílico 2 mM (SA); 5% (v/v) extrato de esporos inativados de *Trichoderma harzianum* (TH); Azoxistrobina-Difenoconazol 50 mg. L⁻¹ (Priori top®, Syngenta) e 50 mg. L⁻¹ acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion®, Syngenta) foram usados individualmente como controles. As plantas foram inoculadas com *S. lycopersici* (1x10⁶ esporos.ml⁻¹, 0,05% v/v Tween 20) 2 dias após os tratamentos e mantidas sob condições de alta umidade (~99% de umidade) por 2 dias). A severidade da doença foi avaliada aos 10 dias após a inoculação (dai).

O efeito *in vitro* sobre *S. lycopersici* foi avaliado pelo método do caldo de microdiluição, seguindo o padrão M38-A, com algumas modificações, padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). A concentração inibitória mínima foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do fungo

Para avaliar o efeito in planta da pulverização dos filtrados e do extrato micelial na germinação de conídios, e o crescimento de hifas epífitas (desenvolvimento de fungos na superfície da folha), segmentos de 4 cm da terceira folha coletados às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai), respectivamente, foram imediatamente processados (Siah et al., 2010).

Para as análises bioquímicas, quatro folíolos do terço médio de cada planta foram coletados aos 0, 24, 48, 72, 96 e 168 hai. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido durante a amostragem e armazenadas em - 80°C até nova análise. As análises realizadas foram a determinação do teor de compostos fenólicos totais de acordo com Bieleski and Turner (1966), atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) de acordo com Kuhn (2007), atividade de peroxidases (POX) de acordo com Matsuno e Uritani (1972), além da determinação da atividade de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase (APX) conforme Nakano e Asada (1981), catalase (CAT), conforme Havir e McHale (1987), e superóxido dismutase (SOD) conforme Giannopolitis e Ries (1977).

Análises quantitativas de peróxido de hidrogênio de acordo com Alexieva et al. (2001), e malondialdeído de acordo com Heath e Packer (1968), foram realizadas em tomateiros tratados com água destilada, 40 % FM ou 40% EM. Quatro folíolos da terceira e quartas folhas de cada planta foram coletadas 24, 48 e 72 h após a inoculação com *S. lycopersici*. As análises de quantificação de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) com coloração DAB (3,30 -diaminobenzidina) foi realizada conforme descrito por Daudi e Brien (2012).

Para realizar a análise paramétrica, foi utilizado o software Statistica 6.0 usados. A homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett a 5% de significância e, quando necessário, os dados foram transformados para a raiz de $x + 1$. A análise de variância foi realizada e o teste de Fisher foi aplicado com 5% de significância. Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram separadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os experimentos foram repetidos duas vezes, análises conjuntas de dados foram realizadas com o GENES software (Cruz, 2013).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação foliar do EM e dos FM de *G. lucidum* no tomateiro, 2 dias antes da inoculação do patógeno, proporcionou reduções significativas na severidade da doença. A redução foi de 93% em média, nas plantas tratadas em comparação ao controle.

A aplicação foliar dos filtrados e do extrato no tomateiro apresentou efeito antifúngico direto contra *S. lycopersici in vitro* e in planta. Foi evidenciada uma redução significativa na percentagem de germinação do fungo, concordando assim com a redução da severidade da doença em testes realizados em casas de vegetação. Estudos anteriores mostraram um efeito inibitório de *G. lucidum* FM na germinação de esporos de *Erysiphe diffusa*, agente causal do oídio da soja (Cruz et al., 2019).

Investigações bioquímicas revelaram que a redução dos sintomas da mancha foliar de septoria nos folíolos das plantas de tomate pode ser atribuída ao estímulo na atividade de FAL e compostos fenólicos em um estágio inicial de desenvolvimento da doença. O tratamento das plantas de tomateiro com FM e EM ativaram o metabolismo secundário vegetal (via fenilpropanóide) indicado pela atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Esta enzima é catalisadora da reação de desaminação da L-fenilalanina e gerando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em muitos compostos fenólicos que estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (Dixon; Paiva, 1995; Vogt, 2010). Compostos fenólicos tem um efeito direto contra patógenos e pode ser usado para

reforçar a planta paredes celulares, impedindo a colonização do patógeno (Strack, 1997).

Plantas tratadas com FM e EM foram mais eficientes na decomposição de espécies reativas de oxigênio (ROS). A pulverização desses materiais aumentou significativamente a atividade da SOD, enzima que catalisa a dismutação do O_2^- em O_2 e H_2O_2 (Wang et al., 2018). Ao mesmo tempo, observou-se um aumento da atividade da CAT, responsável por desintoxicar o H_2O_2 , convertendo-o em água e oxigênio. A enzima APX também teve sua atividade aumentada e, assim como a CAT, catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 , mas usando ascorbato como doador de elétrons (Asada, 1992).

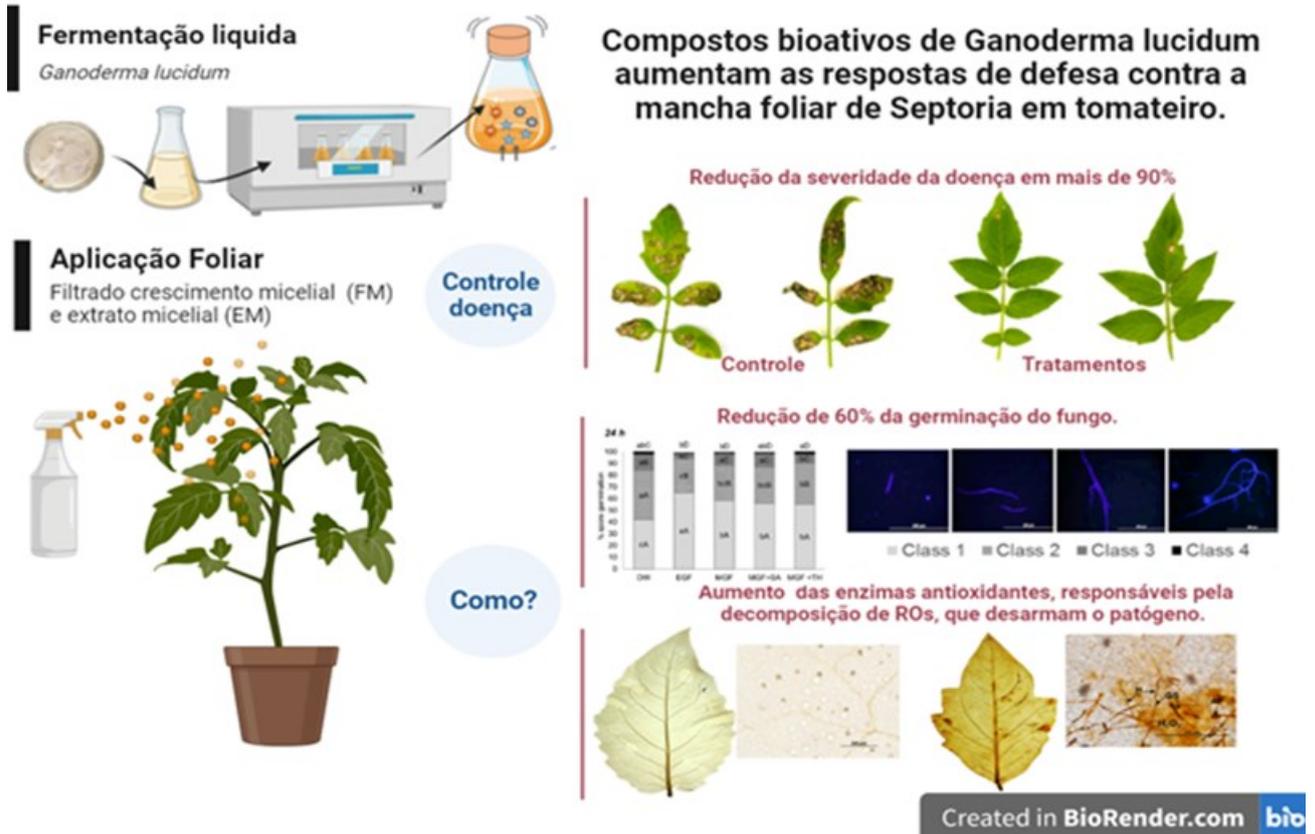
Níveis mais baixos de peróxido de hidrogênio e malondialdeído foram observados em plantas após tratamentos com FM e EM em contraste com o controle. O dano celular intenso da infecção por *S. lycopersici* foi observado em folíolos de tomate de plantas controle, conforme indicado pela grande concentração de MDA, um marcador de peroxidação lipídica. Em contraste, a concentração de H_2O_2 diminuiu nas plantas tratadas com FM e EM o que pode ser devido a elevadas atividades de APX, CAT e POX. Em geral, plantas de tomate pulverizadas com FM e EM e inoculadas com *S. lycopersici* apresentaram menores concentrações de MDA e H_2O_2 em comparação com plantas não inoculadas. Sabe-se que o sistema antioxidante vegetal é especialmente importante na defesa contra patógenos necrotróficos, como *S. lycopersici*, que obtém nutrientes de células mortas. Conforme evidenciado por Mandal et al. (2019), a suscetibilidade das plantas a *Alternaria brassicae* foi associada ao maior acúmulo de ROS e morte celular. Todas essas observações reforçam o interesse nos filtrados e extratos de *G. lucidum* como um promotor de defesa, visto a proteção conferida no tomate à mancha de septoria.

Entretanto, a alta capacidade das preparações brutas em ativar enzimas antioxidantes e de defesa em tomateiro, com redução de mais 90% na severidade da doença, é muito interessante do ponto de vista biotecnológico.

Nossos resultados destacam o potencial biotecnológico dos filtrados e extratos de *G. lucidum* como promotores de defesa em plantas cultivadas, especialmente no controle da mancha de septoria em tomateiro. A capacidade desses preparados em ativar enzimas antioxidantes e fortalecer as defesas das plantas, resultando em uma redução significativa na severidade da doença, sugere sua

aplicação promissora como uma estratégia sustentável de controle de doenças na agricultura.

Figura 8- Principais efeitos do FM e EM no patossistema tomate- *Septoria lycopersici*.



Fonte: Autor (2024).

3.4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que o cultivo do cogumelo *G. lucidum* em meio líquido forneceu preparações com alta capacidade de modificar o metabolismo oxidativo e induziu as defesas do tomateiro com expressivo controle da mancha de septoriose.

Essa descoberta é significativa, pois não apenas evidência o potencial dos compostos derivados do *G. lucidum* no controle de doenças de plantas, mas também destaca a capacidade desses compostos em desencadear respostas de defesa em plantas.

4.CAPÍTULO 2- EFEITO SISTÊMICO DO FILTRADO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *Ganoderma lucidum* SOBRE A SEPTORIOSE E NA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DE *SEPTORIA LYCOPERSICI*.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial do filtrado de crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* e suas frações para proteger plantas de tomate contra *Septoria lycopersici* e seu efeito no desenvolvimento do patógeno e ação sistêmica de controle no tomateiro. Em casa de vegetação, a aplicação foliar de FM a 40 % (v/v) 2 dias antes da inoculação do fungo reduziu em 76% a severidade aos 21 dias após a inoculação do patógeno. Houve redução significativa nas taxas de estômatos colonizados e na formação de picnídios no mesofilo das folhas tratadas, com a formação de apenas 10 picnídios/lesão, contra 22,05 picnídios/lesão nas plantas controle. O efeito sistêmico no controle da doença foi observado a partir da irrigação da raiz e pulverização das folhas com FM. A ação antifúngica direta do FM e suas frações sobre o patógeno foi demonstrada em testes *in vitro*. Portanto, o cultivo do cogumelo *G.lucidum* em meio líquido gerou preparações com atividade antimicrobiana direta e controle da mancha de septoria local e sistemicamente. Concluiu-se que os compostos bioativos liberados no cultivo submerso de *G. lucidum* apresentam potencial de utilização no manejo de doenças do tomateiro.

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*; biocontrole; antifúngico; efeito sistêmico; controle de doença.

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Septoria* engloba patógenos emergentes de diversas famílias de plantas e tem sido relatada em todo o mundo doenças foliares que infectam a parte aérea das plantas, caule e frutos (Das et al., 2020). A mancha de *Septoria* (SLS), causada pelo fungo *Septoria lycopersici* Spegazzini, representa grande importância no processo produtivo do tomateiro, causando elevados prejuízos (Mattos et al., 2020).

Os sintomas da doença ocorrem em todos os estágios de desenvolvimento do tomateiro. No estágio inicial da infecção, os sintomas aparecem como lesões necróticas circulares e angulares mais comumente encontradas nas folhas mais velhas e inferiores da planta. As lesões maduras contêm pequenos, mas visíveis, corpos frutíferos pretos característicos, os picnídios, os quais liberam picnidiosporos produzidos assexuadamente (conídios). Os conídios são geralmente responsáveis pela propagação da doença. A redução da área foliar fotossintética causada pela doença pode levar a perdas de produtividade de até 50% quando o manejo integrado da doença é implementado (Agrios, 2005; Mattos et al., 2020)

O controle da SLS se baseia principalmente no uso de fungicidas e cultivares parcialmente resistentes (Ávila et al., 2020). No entanto, devido à alta diversidade genética e adaptabilidade de *S.lycopersici*, o fungo frequentemente desenvolve resistência a fungicidas e muitas vezes supera a resistência do hospedeiro, tornando-se um dos patógenos de plantas mais difíceis de controlar (Ávila et al., 2020; Baldicera et al., 2020). Devido às enormes perdas de colheitas em todo o mundo causadas por SLS, há uma grande demanda por desenvolvimento de novas estratégias de manejo para uso na agricultura.

A pesquisa tem demonstrado potencial na exploração e descoberta de compostos antimicrobianos extraídos de cogumelos para o controle de patógenos de plantas, como é evidenciado pela descoberta das estrobilurinas naturais, a partir do

cogumelo *Strobilurus tenacellus* (Imtiaj; Lee, 2007), os quais deram origem a um dos grupos de fungicidas mais utilizados no mundo.

Outro cogumelo com grande potencial na exploração de compostos antimicrobianos é o *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. [Ling Zhi], um dos cogumelos medicinais mais conhecidos e usados pela medicina tradicional nos países asiáticos há milhares de anos (Lu et al., 2020). Nas modernas investigações farmacológicas são relatados registros de mais de 400 compostos secundários isolados dos corpos frutíferos, micélio e cultivo submerso de *G. lucidum*, que incluem na sua maioria polissacarídeos, triterpenóides, proteínas, peptídeos, adenosina e nucleosídeos. Estes apresentam atividade imunológica, antiviral, antialérgica, antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica (Gu et al., 2018).

Estudos demonstraram que espécies de *Ganoderma* exibem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo atividade antifúngica e antibacteriana direta, estímulos ao crescimento e à ativação de respostas de defesa vegetal. Em soja, foi observado que os filtrados de *G. lucidum* ativam os mecanismos de defesa da planta, auxiliando no controle do oídio (Cruz et al., 2019). Recentemente, Yang et al. (2022) relataram que o polissacarídeo extraído do corpo de frutificação de *G. lucidum*, quando combinado ao tratamento químico de sementes, foi eficiente no controle de podridão radicular do milho causada por *Fusarium graminearum* e da mancha aguda do trigo causada por *Rhizoctonia cerealis*, além de apresentar efeito de bioestímulo nas plantas, promovendo o aumento na taxa de germinação e altura. Fátima et al. (2022) relataram que a imersão da raiz de beringela por 30 min com filtrados de cultura de *Ganoderma lucidum* reduziu o nível de infecção de *Meloidogyne incognita* e promoveu o crescimento vegetal.

Em um trabalho prévio, a pulverização do FM no tomateiro reduziu a severidade da septoriose em mais de 90% nas folhas tratadas, além de promover o aumento na atividade da FAL e de enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidante (Cruz et al., 2022). O objetivo do atual estudo é o de verificar se o FM apresenta efeito sistêmico para o controle da doença e se afeta a produção de estruturas reprodutivas por *S. lycopersici*.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Materiais biológicos

Sementes de tomate cv. Santa Cruz Kada, suscetível a *Septoria lycopersici*, foram semeadas em substrato Tropstrato®. No 15º dia após a semeadura, as mudas de tomate foram transplantadas para vasos de 2 L contendo substrato comercial (Solo Fertilizado®, Solo Fértil Insumos Agrícolas LTDA, Santa Catarina, Brasil) e mantidas em casa de vegetação ($25,3 \pm 3,7$ °C) até a implantação dos bioensaios.

Septoria lycopersici foi isolado de folhas de tomateiro com sintomas típicos de mancha foliar. O isolado foi depositado na coleção micológica da Universidade Federal de Santa Catarina (isolado número 106). Para experimentos posteriores, o fungo foi cultivado em meio de cultura V8-ágar (2 % v/v suco V8, 2 g.L⁻¹ CaCO₃ e 15 g.L⁻¹ ágar) por 10 dias em fotoperíodo de 12 h a 25 °C. Para a coleta de esporos foram depositadas em cada placa 10 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi filtrada duas vezes para remover fragmentos de micélio e a concentração de esporos foi determinada e ajustada usando uma câmara de contagem Neubauer.

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst. (isolado CC339ST) foi obtido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, a Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil). Placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA; Kasvi, Brasil) foram inoculadas com plugs de micélio CC339ST, incubadas por 7 dias a 28 ± 2 °C em um fotoperíodo de 12 h e armazenadas a 4 °C para uso posterior.

Para a obtenção do filtrado do crescimento micelial de *Ganoderma lucidum*, dez discos miceliais (0,5 cm Ø) foram transferidos para frascos erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD) pH 5,1. Os frascos foram mantidos em mesa de agitação (120 rpm) a 28 ± 2 °C, no escuro, por 15 dias. Após esse período, foi realizada a filtragem em filtro Whatman no.41 obtendo-se assim o filtrado do crescimento micelial (FM) de *G. lucidum*

4.2.2 Efeito local e sistêmico do FM sobre a severidade da doença

Plantas de tomate contendo quatro folhas verdadeiras, mantidas em casa de vegetação, foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com água destilada (controle), com o FM na concentração de 40 % (v/v), ou com 50 ppm de um produto comercial a base de Azoxistrobina + Difenconazole. Passadas 48 h, as plantas foram inoculadas com *S. lycopersici* (1×10^6 esporos.mL⁻¹ contendo 0,05% v/v Tween 20) e mantidas em câmara úmida por 24 h. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (dai). Com os dados de severidade, calculou-se a área sob a curva de progresso da doença (AACPD), que leva em consideração a intensidade da doença e sua evolução no tempo (Campbell; Madden, 1990). A área abaixo da curva de progresso da doença foi calculada da seguinte forma:

$$AACPD = n \sum_{i=1}^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$$

Em que: Y_i : severidade da doença (nota por parcela em %) na i -ésima observação; Y_{i+1} : severidade da doença na época da avaliação $i+1$; X_i : tempo (dias) na i -ésima observação; X_{i+1} : época da avaliação $i+1$; n : número total de observações.

Para a avaliação do efeito sistêmico de controle, dois tipos de experimentos foram conduzidos: no primeiro, para avaliar a sistemicidade ascendente do FM, plantas de tomate com quatro folhas verdadeiras, cultivadas como descrito anteriormente, foram pulverizadas foliar até o escorrimento e irrigadas (raiz) com 30 mL de água destilada (controle). O efeito do FM a 40% (v/v) sobre a severidade da doença foi avaliado pela aplicação foliar (efeito local) ou irrigação do sistema radicular (efeito sistêmico) com o filtrado. Passadas 48 h, as plantas foram inoculadas com *S. lycopersici* (1×10^6 esporos.mL⁻¹, 0.05% v/v Tween 20) e mantidas em câmara úmida por 24 h. A severidade da doença foi realizada aos 14 dias após a inoculação (dai).

Para avaliar a sistemicidade descendente do FM, plantas de tomate contendo quatro folhas verdadeiras, mantidas em casa de vegetação, foram pulverizadas apenas nas duas folhas superiores com água destilada (controle) ou com o FM na concentração de 40 % (v/v). Passadas 48h, as plantas foram inoculadas com *S. lycopersici* (1×10^6 esporos. mL⁻¹, 0.05% v/v Tween 20) em todas as suas folhas e mantidas em câmara úmida por 24 h. A avaliação de severidade da doença foi realizada nas folhas superiores que receberam os tratamentos (efeito local) e nas

folhas do baixeiro que não haviam recebido os produtos (efeito sistêmico). A severidade da doença foi realizada aos 14 dias após a inoculação (dai).

4.2.3 Efeito na formação de picnídios e colonização estomática

Plantas de tomate contendo quatro folhas verdadeiras, mantidas em casa de vegetação, foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com água destilada (controle), com o FM na concentração de 40 % (v/v), ou com 50 ppm de um produto comercial a base de Azoxistrobina + Difenconazole. Passadas 48 h, as plantas foram inoculadas com *S. lycopersici* (1×10^6 esporos. mL⁻¹ contendo 0,05% v/v Tween 20) e mantidas em câmara úmida por 24 h.

Para medir a densidade de picnídios e avaliar a colonização de *S. lycopersici*, segmentos de 4 cm da terceira folha foram coletados aos 21 dai e depois branqueados em mistura de etanol absoluto e ácido acético (3:1; v/v) durante a noite. As folhas clareadas foram reidratadas em água destilada por 4 h e então fixadas em lactoglicerol (ácido láctico: glicerol: água; 1:1:1; v/v/v) por 20 min. As estruturas fúngicas foram coradas pela imersão dos segmentos foliares em azul de Trypan 0,1% (Sigma-Aldrich) dissolvido em lactofenol-etanol (1:2; v/v) a 50°C por 20 min. Após a lavagem, os segmentos foliares foram colocados em uma lâmina de vidro com uma gota de lactoglicerol e observados microscopicamente em aumento de 400x. A colonização das cavidades estomáticas foi determinada a partir de 100 cavidades subestomáticas escolhidas aleatoriamente avaliando: estômatos não colonizados (NC), estômatos colonizados, mas ainda sem formação de picnídio (C) e estômatos colonizados com formação por picnídio (P). As fotos foram tiradas com a câmera digital (Olympus DP71-U-TV0.5XC-3).

A quantidade de picnídios foi avaliada aos 21 dias após a inoculação (dai) (Ors et al., 2018). A densidade de picnídios foi avaliada pelo NPL (número médio de picnídios por lesão), foram pontuadas 2 lesões por folha, no total de 4 folhas do terço médio por tratamento, compreendendo lesão a área foliar necrótica com picnídios, respectivamente. O delineamento experimental foi completamente ao acaso, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por duas plantas.

4.2.4 Fracionamento e atividade antifúngica *in vitro*

Inicialmente, um litro do filtrado do crescimento micelial bruto (FM) foi concentrado 30x em rotaevaporador (90°C), obtendo-se um filtrado concentrado (FC). O FC foi liofilizado e fracionado. O FC foi submetido à cromatografia utilizando-se uma coluna sílica-gel com eluentes acetatos de etila e água sob a forma de um gradiente crescente de polaridade. Inicialmente, o FC foi ressuscitado com etanol e o meio líquido particionado em coluna de separação contendo sílica gel com acetato de etila, do particionamento na coluna obtendo-se fração polar que foi ressuscitada em 5 mL de água destilada, a fração apolar em 2mL de dimetilsulfóxido a 2% (DMSO). O filtrado de crescimento micelial (FM), filtrado concentrado no rotaevaporador a 90 C° (FC), fração polar (FCP) e a fração apolar (FCA), foram esterilizados em membrana tipo Millipore® (diâmetro do poro = 0,2 µm) sob condições assépticas e utilizados para testes *in vitro*. As frações foram liofilizadas e testadas quanto à atividade antifúngica.

A atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Septoria lycopersici* (cepa 106) foi avaliada pelo método do caldo de microdiluição, seguindo o padrão M38-A, com modificações, padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). Em placas de microdiluição de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BD batata-dextrose (BD; Kasvi, Brasil) e 200 µL de: (1) filtrado de crescimento micelial (FM), (2) filtrado concentrado (FC), (3) fração polar (FCA), (4) fração apolar (FCA), todos na concentração de 100% (v/v). Os controles foram constituídos por água destilada (AD) e meio líquido de batata-dextrose (BD). Cada solução foi pipetada apenas no primeiro poço da coluna e a partir daí foi realizada uma diluição seriada, com as concentrações finais obtidas: 50, 25, 12.5, 6.26, 3.125, 1.576, 0.78 e 0.39 (v/v). Alíquotas de 10 µL contendo 1.106 esporos mL⁻¹ de *Septoria lycopersici* foram adicionados a cada poço da placa. Em cada microplaca, meio BD não inoculado com patógeno, e meio BD inoculado com patógeno, foram usados como controles experimentais, apenas os filtrados sem inoculação também foram utilizados como controle. As microplacas foram incubadas por 7 dias em câmara de crescimento a 25 °C ± 1 °C no escuro. O crescimento do fungo foi medido a 3, 5 e 7 dias, usando

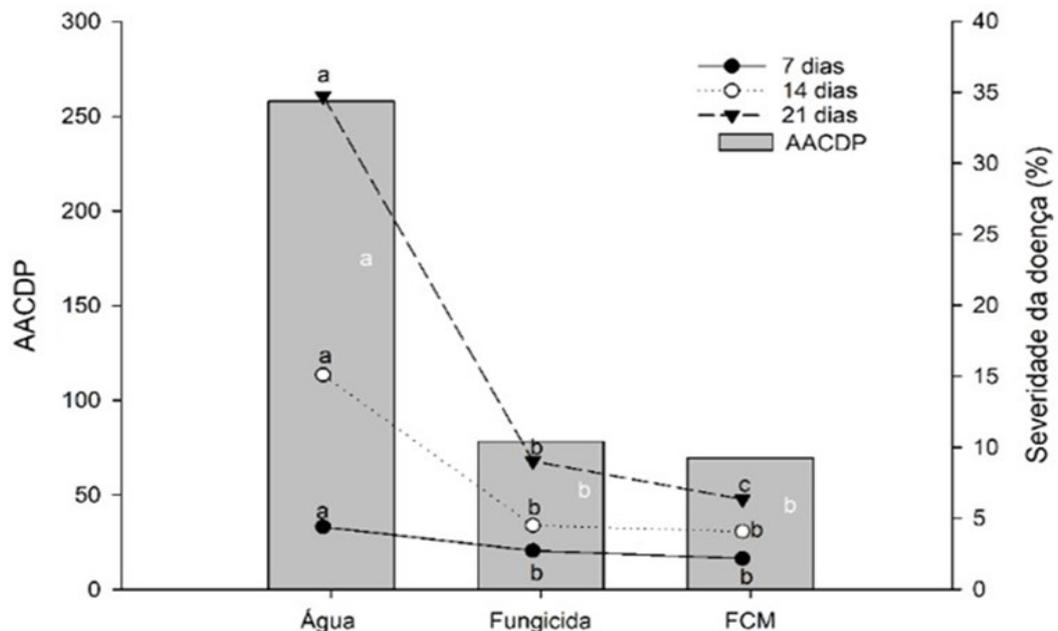
um leitor de placas a 405 nm. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo.

5. RESULTADOS

5.1 Comparação entre FM e fungicida tradicional para o controle da septoriose

Neste estudo, a eficácia de proteção do filtrado em tomateiro contra *S. lycopersici* foi avaliada em casa de vegetação por pulverização de plantas de tomate, 2 dias antes da inoculação. O FM foi comparado a um fungicida à base de Azoxistrobina e Difenconazole. A pulverização do filtrado micelial de *G. lucidum* reduziu a severidade e a curva do progresso da doença. A eficiência de controle aos 21 dias após a inoculação foi de 76% de redução de severidade com aplicação do filtrado e 66% com aplicação do fungicida (Figura 9).

Figura 9 - Severidade e área abaixo da curva do progresso da doença (AACDP) da mancha de septoria em plantas de tomate, em função da aplicação do filtrado de crescimento micelial de *G. lucidum*, FM; fungicida a base de Azoxistrobina e Difenconazol ou água destilada. Valores representam médias de três avaliações \pm desvio padrão da média. Médias seguidas por letras iguais, no mesmo tempo de avaliação, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



5.2. Efeito sistêmico do FM sobre a septoriose

Com a aplicação no sistema radicular do tomateiro, observou-se um efeito sistêmico ascendente do FM, promovendo uma redução de 62% na severidade da septoriose na parte aérea das plantas aos 14 dai, enquanto a pulverização foliar do filtrado (efeito local) foi mais eficiente, com redução de 87% na doença (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da aplicação foliar e irrigação radicular com FM sobre a severidade da mancha de septoria em tomateiro.

Tratamento	Severidade e (%)	Eficiência de controle (%)
Testemunha	33,84 a	0
FM pulverizado	4,24 c	87
FM irrigado	12,08 b	62
DMS (5%) = 2.32		

*Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A aplicação do filtrado micelial apenas nas folhas superiores do tomateiro promoveu um efeito sistêmico descendente na planta, reduzindo em 56% a severidade da mancha de septoria nas folhas baixas do tomateiro, as quais não haviam recebido a aplicação direta do filtrado. Novamente, o efeito local do filtrado foi mais pronunciado que o sistêmico, com redução de 89% da severidade nas folhas tratadas (Tabela 2). O fungicida utilizado para comparação apresentou 93 e 85% de controle local e sistêmico da septoriose, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito local ou sistêmico da aplicação foliar com FM sobre a severidade da mancha de septoria em tomateiro

Tratamento	Severidade (%) Efeito Local) ^a	Severidade (%) (Efeito Sistêmico) ^b
Testemunha	37,85 aA	35,09 aA
Fungicida	2,62 aC	5,30 bC
FM	4,12 bB	15,25 aB
DMS (5%) = 2.45		

^aAvaliação de folhas diretamente pulverizadas com os produtos; ^bAvaliação das folhas inferiores de plantas pulverizadas nas folhas superiores.

Médias seguidas da mesma letra minúscula na horizontal, ou maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. ***Coefficiente de variação dos tratamentos.**

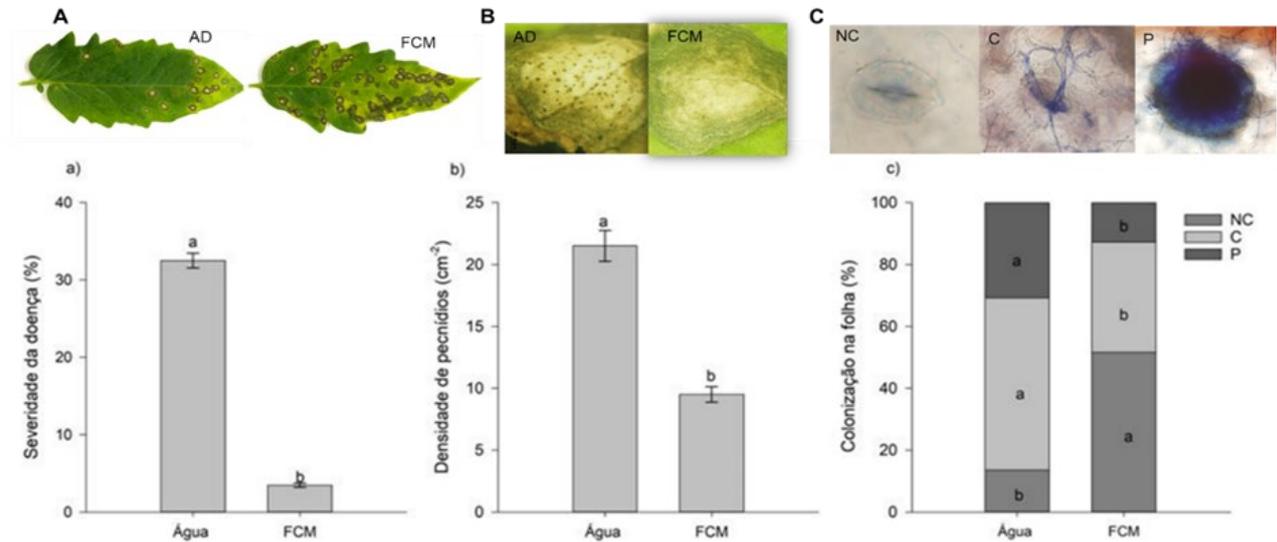
5.3 Efeito do filtrado micelial na formação de picnídios por *S. lycopersici*

Os primeiros sintomas da mancha de septoria, através de manchas cloróticas e necróticas, apareceram entre 10 a 14 dai nas folhas tratadas com água destilada e o filtrado micelial, respectivamente. Aos 21 dai, a severidade da doença foi de 35%, com uma densidade de 22,05 picnídios/lesão nas plantas controle. A pulverização do filtrado micelial de *G. lucidum* reduziu significativamente a severidade da doença em 88% (Fig. 2A), com a formação de apenas 10 picnídios/lesão, ou seja, uma redução superior a 50% no número de picnídios formados (Fig.2 B).

Observações microscópicas revelaram que os esporos do fungo penetram diretamente e por estômatos nas folhas, porém os picnídios se formam apenas nas aberturas estomáticas das folhas. As avaliações in planta revelaram que as taxas de estômatos não colonizados foram de 54% nas folhas tratadas com filtrado micelial contra 15 % das plantas tratadas com água (Fig. 2.C), do mesmo modo revelou redução significativa na formação de picnídios quando comparadas com o controle (Fig. 2C). Ou seja, a aplicação foliar do filtrado micelial promoveu uma redução significativa na formação de picnídios em plantas de tomate, concordando com a redução da severidade da doença observada.

Figura 10 - Severidade da mancha de septoria (A), densidade de picnídios (B) e colonização (C) nas terceiras folhas de tomateiro pré-aspergidas com água (controle) ou FM (40% v/v) e avaliados aos 21 após a inoculação com *Septoria lycopersici*. As plantas foram inoculadas 2 dias após os tratamentos. As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste t de Student em $P \leq 0,05$. As barras representam os desvios padrão da média; NC, estômatos não colonizados; C, estômatos colonizados, mas ainda não preenchidos com picnídio; P, estômatos

colonizados preenchidos por um picnídio. Barra de escala = 100 μm (C) e 10 μm (C).



Fonte: Autor (2023).

5.4 Determinação da concentração inibitória mínima

Os filtrados de *G. lucidum* FM e FC mostraram ação antimicrobiana direta *in vitro* sobre esporos de *S. lycopersici*. Concentrações inibitórias mínimas verificadas foram 25 v/v para o FM e 6,25 v/v para FC (Tabela 3). As frações demonstraram ação antimicrobiana semelhante aos filtrados brutos, com concentrações inibitórias mínimas de 50 v/v para fração apolar e de 25 v/v de inibição com fração polar.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima *in vitro* de filtrado e frações de *G. lucidum* sobre esporos de *S. lycopersici* pelo método do caldo de microdiluição.

Tratamentos	MIC (v/v)
Água destilada	-
Meio BD	-
Filtrado micelial - FCM	25
Filtrado concentrado -FC	6,25
Fração apolar -FA	50
Fração polar - FP	25

Figura 11. Efeito do filtrado de crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (FM) sobre *Septoria lycopersici* pelo método do caldo de microdiluição. Em (A), foto da microplaca ilustrando os resultados. Em (B), o crescimento do patógeno avaliado através da absorbância a 405 nm, em diferentes diluições.

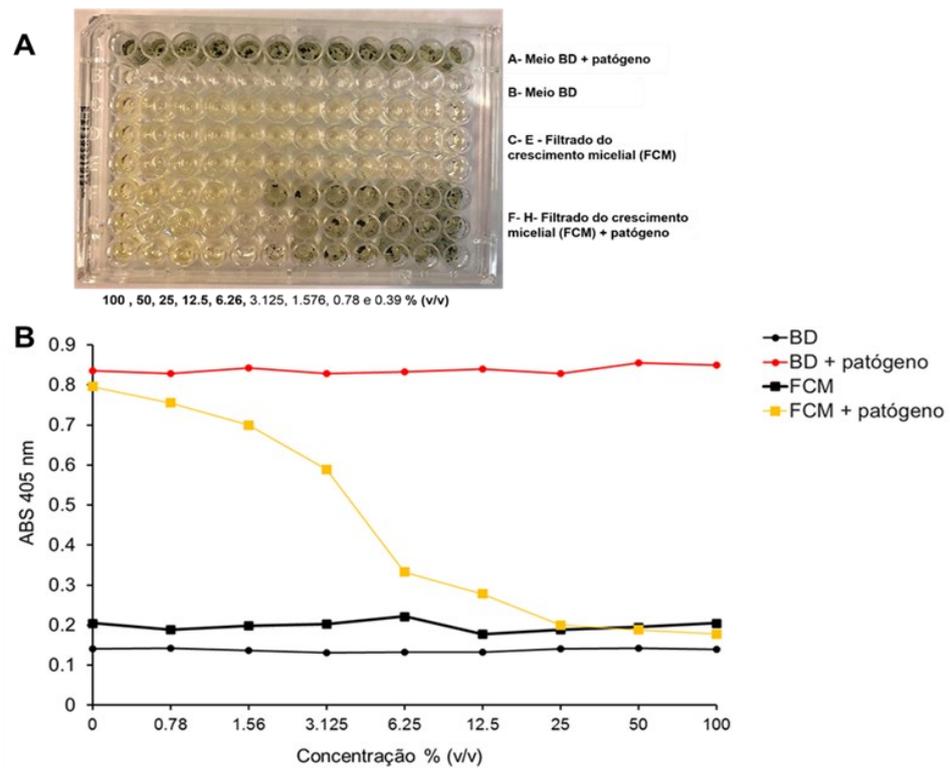
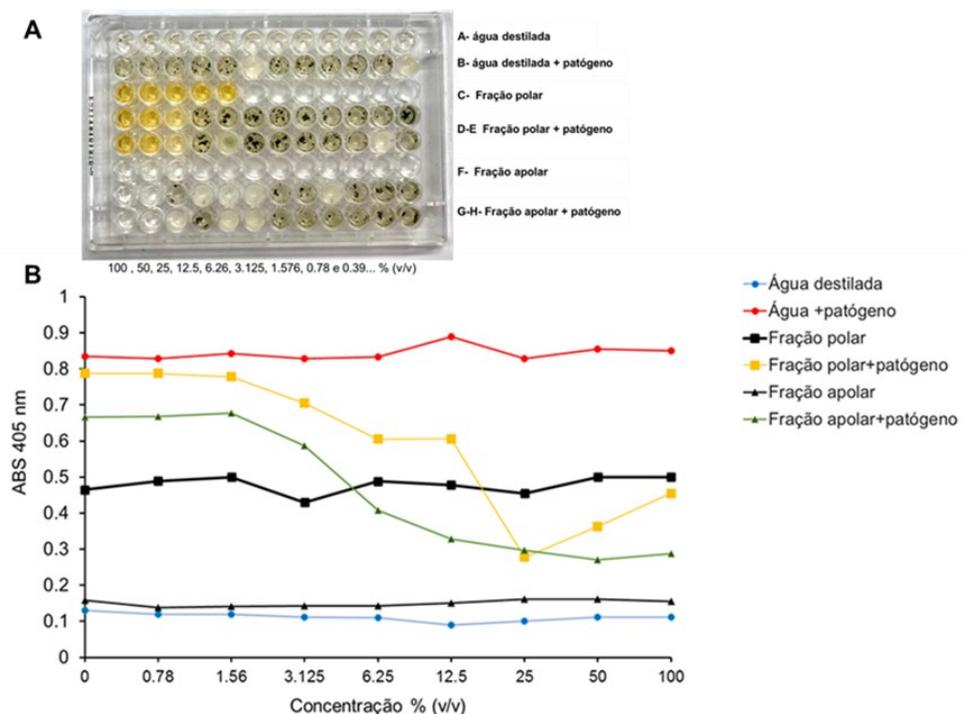


Figura 12. Efeito das frações polar e apolar de *Ganoderma lucidum* sobre *Septoria lycopersici* pelo método do caldo de microdiluição . Em (A), foto da microplaca ilustrando os resultados. Em (B), o crescimento do patógeno avaliado através da absorbância a 405 nm, em diferentes diluições.



6.DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios na produção agrícola é manter altos níveis de produtividade sem aumentar o impacto ambiental. Presume-se que o controle biológico e que substâncias indutoras de resistência devam crescer no mercado mundial, diante dos desafios para o controle de doenças e pragas na agricultura. Além do mais, sabe-se que fermentados fúngicos e extratos constituem uma fonte de prospecção de novas moléculas com potencial para esses usos.

Como uma ferramenta para uso no manejo de doenças, relatamos a aplicação preventiva do filtrado de *G. lucidum* em tomateiro. No presente estudo, a pulverização reduziu a severidade da mancha de septoria em mais de 70%, revelando ser tão eficiente no controle da doença quanto a utilização de fungicida. Há indícios, com base nos resultados do efeito da aplicação do FM sobre a germinação de esporos de *S. Lycopersici* de que há efeito direto de moléculas presentes no FM de *G. lucidum* (Cruz et al.,2022). No atual estudo, observou-se que plantas pulverizadas preventivamente com o FM apresentaram uma redução significativa na taxa de estômatos colonizados e, conseqüentemente, no número de picnídios/lesões. Picnídios são estruturas reprodutivas assexuadas do fungo *Septoria lycopersici*, de onde os conídios são liberados nas formas de cirros, hialinos, aglutinados entre si por uma substância mucilaginosa. O estágio sexual do fungo ainda não foi registrado na literatura (Jones et al., 1991; Lopes et al., 2005). O efeito do FM sobre a redução da produção de estruturas reprodutivas do patógeno poderia influenciar o progresso da doença no decorrer do tempo. Contudo, não é possível afirmar se esse efeito sobre o fungo está relacionado à indução de mecanismos de defesa na planta ou se deve por meio da ação de metabólitos de *G. lucidum* presentes no FM.

Recentemente, possíveis mecanismos de ação dos compostos bioativos de *G. lucidum* tem sido descoberto com destaque para o efeito direto sobre fitopatógenos ou na ativação de mecanismos de defesa da planta (Cruz et al., 2019; Cruz et al., 2022; Zhang et al., 2019). Em estudos anteriores, verificou-se que a aplicação preventiva do filtrado de *G. lucidum* ativou mecanismos de defesa da soja por meio de um processo chamado resistência adquirida, auxiliando no controle do oídio (Cruz et al., 2019). Os compostos presentes no filtrado micelial de *G. lucidum* ativaram mecanismos de defesa do tomateiro, reduzindo o dano oxidativo causado por *S.*

lycopersici e alterando as concentrações de flavonóides e compostos fenólicos totais (Cruz et al., 2022).

Demais estudos corroboram com nossos achados. Em pesquisa realizada por Yang et al. (2022), o filtrado *G. lucidum* (GLP) quando combinado ao tratamento químico de sementes foi eficiente no controle de podridão radicular do milho causada por *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia cerealis* no trigo, além de promover aumento das taxas de germinação e altura das mudas. Zhang et al. (2019) relataram que o tratamento de mudas de algodão por imersão com polissacarídeo de *G. lucidum* foi eficiente no controle de murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum*), com efeito direto sobre o patógeno e aumentando a resistência da planta a doença pelo aumento da atividade de peroxidase, superóxido dismutase e polifenol oxidase.

Sabe-se que o processo de indução de resistência pode ocorrer localmente na planta, ou seja, no tecido onde o agente elicitor foi aplicado ou sistemicamente quando partes da planta não expostas ao elicitor sofrem alterações metabólicas que desencadeiam mecanismos de defesa (Boller; Félix, 2009; Jones; Dangl, 2006). O efeito de controle sistêmico na planta foi demonstrado neste estudo por meio de dois experimentos. No primeiro, a irrigação da raiz com FM promoveu o controle da mancha de septoria em 62%. No segundo experimento, folhas que não receberam a pulverização direta com FM apresentaram severidade 56% menor do que folhas das plantas não tratadas. Sabe-se que a translocação de seiva bruta ocorre no sentido ascendente na planta via xilema, enquanto os vasos do floema conduzem seiva elaborada tanto ascendente quanto descendentemente (Taiz et al., 2021). Enquanto no primeiro experimento o produto foi aplicado nas raízes, ressalta-se que nesse segundo experimento foram tratadas as folhas de cima e houve redução da severidade das folhas do terço inferior da planta. Isso pode indicar que produtos do metabolismo de *G. lucidum* podem estar sendo translocados tanto via xilema quanto via floema ou, podem estar influenciando na produção e translocação de sinalizadores de defesa da própria planta como ácido jasmônico e ácido salicílico (Maruri-López et al., 2019; Taiz et al., 2021). O efeito sistêmico do FM no controle da mancha de septoria é um destaque importante para esse patossistema, tendo em vista que as folhas mais velhas são mais suscetíveis à doença (Mattos et al., 2020).

A produção comercial de metabólitos secundários de cogumelos medicinais ainda é limitada principalmente devido a poucas informações sobre o metabolismo secundário e sua regulação. Estratégias para aumentar a produção de metabólitos

secundários por cultivo submerso de cogumelos medicinais incluem cultivo em dois estágios combinando cultivo líquido e cultura estática, controle de oxigênio dissolvido em dois estágios, etc (Liu et al., 2018; Wan et al., 2016). Dentre esses metabólitos secundários presentes na fase micelial de *G. lucidum* citados no trabalho de Satria et al. (2019), 42 metabólitos que apresentam relevância, o crisofanol tem sido relatado como um inibidor altamente ativo de fungos patogênicos em plantas, pela supressão do crescimento micelial (Choia et al., 2004). O ergosterol, um esterol que pode ser encontrado apenas em fungos, foi relatado para ter a capacidade de ativar a enzima de defesa em plantas, contra fungos patogênicos (Shao et al., 2010). Vários triterpenóides do tipo lanostano, como ácido ganodérico C6, ácido ganodérico H e outros metabólitos não identificados foram produzidos em quantidades mais altas na fase micelial (Satria et al., 2019). Esses fatos mostram que existe uma forte correlação entre os metabólitos secundários e sua atividade biológica. No entanto, a função de muitos metabólitos secundários fúngicos ainda permanece desconhecida.

Fátima et al. (2022) revelaram que a produção de diferentes compostos de *G. lucidum* são tóxicos sobre juvenis de *M. incognita*, inibindo a eclosão dos ovos e reduzindo a população de nematóides. A imersão da raiz de plantas de beringela com o filtrado levou a mais de 80% de mortalidade de juvenis in vitro e em casa de vegetação, além de promover o crescimento vegetal, com aumento no comprimento da planta, massa fresca da planta, peso seco da planta, clorofila total, carotenóides e rendimento/planta. A análise cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) do píleo e estipe de *G. lucidum* explorou treze diferentes compostos bioativos com efeito tóxico sobre juvenis de *M. incognita*, que pertencem a diversos grupos de metabólitos secundários, incluindo pironas, glicosídeos, álcoois de açúcar, silanos e esteróides presentes no píleo, além de cetonas cíclicas, palmitatos, linoléicos ácidos, ácidos oleicos, éster de ácido tânico presentes no estipe de *G. Lucidum*.

Na tentativa de fracionar classes de compostos bioativos por meio da separação do FM, obtivemos uma fração polar e apolar. Foi observado que o FM e suas frações agem diretamente sobre o patógeno, inibindo a germinação e o crescimento in vitro. Obtivemos concentrações inibitórias mínimas de 25 v/v para FM e 50 v/v para fração apolar e de 25 v/v de inibição com fração polar. Não houve diferenças significativas entre o desempenho das frações FP e FA nos experimentos in vitro, sugerindo que os dois podem apresentar compostos bioativos, com ação

direta sobre o patógeno. Provavelmente, os compostos ativos contidos neles têm um efeito tóxico direto nas hifas, limitando o desenvolvimento do patógeno.

Nossos resultados corroboram com outros estudos que demonstram efeito antimicrobiano do filtrado e extratos de *G. lucidum* contra patógenos distintos, incluindo fungos e bactérias. Saldares et al. (2023) demonstraram efeito antimicrobiano de extratos de *Ganoderma* sp. contra diferentes patógenos de plantas, como *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis palmarum*, *Alternaria solani*. Em outro estudo, os polissacarídeos de *G. lucidum* foram extraídos com água fervente e apresentaram efeito inibitório sobre *Erwinia carotovora*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* (Bai et al., 2008).

Compostos bioativos produzidos por *G. lucidum* podem ser explorados como agentes de biocontrole, e demonstram grande potencial de serem utilizados no sistema produtivo via aplicações radiculares e foliares.

7. CONCLUSÃO

O cultivo submerso de fungos como o *Ganoderma lucidum*, compreendem uma abordagem inovadora e altamente eficaz, que requer uma investigação contínua e estudos aprofundados. No entanto, ela tem o potencial de contribuir significativamente para a extração de substâncias com propriedades promissoras no controle de patógenos de interesse agrônomico. Esta técnica oferece uma oportunidade para explorar novas fontes de compostos bioativos que podem ser utilizados de forma sustentável na agricultura. Através de pesquisas adicionais e colaboração entre diversos especialistas, podemos desvendar todo o potencial dessa abordagem e aplicar seus benefícios para melhorar a produtividade e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Com base em nossos resultados enfatizamos que o cultivo do cogumelo *G. lucidum* em meio líquido gerou preparações com capacidade de atividade antimicrobiana direta e controle da mancha de septoria local e sistemicamente. Concluiu-se que os compostos bioativos liberados de *G. lucidum* podem ser estudados e aprimorados para o desenvolvimento de um produto de biocontrole promissor para futuras estratégias de manejo de doenças de plantas. Novos estudos

devem ser considerados, buscando identificar e isolar os princípios ativos presentes nos filtrados e aumentar sua eficiência de produção, em escala industrial.

REFERÊNCIAS

ACHUO, E. A. *et al.* The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, v. 53, n. 1, p. 65-72, 2004.

AGRIOS, G. N. Introduction to plant pathology. **Elsevier Academic Press Publication**, 2005.

ALEXIEVA, V., I. SERGIEV, S. MAPELLI, AND E. KARANOV. "The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat." **Plant, Cell & Environment** 24, no. 12 (2001): 1337-1344.

ALVARENGA, M.A.R. Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA, 2004. 400p.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ASSI, L. *et al.* Control of *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato by *Pycnoporus sanguineus* formulated extract. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 314-320, 2017.

ÁVILA, M. C. R. *et al.* Field validation of TOMCAST modified to manage Septoria leaf spot on tomato in the central-west region of Brazil. **Crop Protection**, v. 138, p. 105333, 2020.

BAI, D. *et al.* Antiplastic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Agric. Boreali Sin**, v. 23, p. 282-285, 2008.

BALDICERA, A. K. *et al.* Sensitivity of *Septoria lycopersici* isolates and effectiveness of fungicides for the control of Septoria leaf spot in tomato. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 19, n. 2, p. 159-170, 2020.

BETTIOL, W. *et al.* Produtos comerciais à base de Trichoderma. **Trichoderma**, p. 45, 2019.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BOH, B. *et al.* *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. **Biotechnology annual review**, v. 13, p. 265-301, 2007.

BOLLER, T; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAO, P. F. *et al.* Effects of exogenous salicylic acid on ganoderic acid biosynthesis and the expression of key genes in the ganoderic acid biosynthesis pathway in the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 1, p. 65-73, 2017.

CHENG, C. R. *et al.* Preparative isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by counter-current chromatography combined with pH-zone-refining. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, pp. 1010-1016, 2012.

CHOI, S. *et al.* Anti-inflammatory and heme oxygenase-1 inducing activities of lanostane triterpenes isolated from mushroom *Ganoderma lucidum* in RAW264.7 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 434-442, 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002. Reference method for broth dilution tests to determine susceptibility to antifungal therapy of filamentous fungi; approved standard. NCCLS, Wayne. (NCCLS granted translation permission to Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, Brazil).

CLUZET, S. *et al.* Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**. v. 27, n. 7, p. 917–928, 2004.

CRUZ, M. P. *et al.* Bioactive compounds of *ganoderma lucidum* activate the defense mechanisms of soybean plants and reduce the severity of powdery mildew. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 13, p. 99, 2019.

CRUZ, M. P. *et al.* *Ganoderma lucidum* mycelial growth filtrate and the mycelial extract increase defense responses against *Septoria* leaf spot in tomato. **Biological Control**, v. 173, p. 105002, 2022.

DAM, B.V. *et al.* A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. **Agrodok**, 2006.

DAS, SIDDHARTHA, SUDEEPTA PATTANAYAK, AND BODDEPALLI BHARGAVI. "Over view of *Septoria* diseases on different crops and its management." **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology** 13, no. 3 (2020): 351-370.

DANGL, J. L.; JONES, Jonathan DG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-833, 2001.

DIXON, RICHARD A., AND NANCY L. PAIVA. "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." **The plant cell** 7, no. 7 (1995): 1085.

DONG, XINNIAN. "NPR1, all things considered." *Current opinion in plant biology* 7, no. 5 (2004): 547-552.

ESPINOSA-GARCÍA, V. et al. Biological activities of different strains of the genus *Ganoderma* spp.(Agaricomycetes) from Mexico. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 2, 2021.

FANG, Q. H., & ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2002.

FÁTIMA, S. *et al.* Root-Knot Disease Suppression in Eggplant Based on Three Growth Ages of *Ganoderma lucidum*. **Microorganisms**, v. 10, p. 1068, 2022.

FAOSTAT. *Food and agriculture organization of the United Nations Database*, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, Rome, Italy. 2016.

FILGUEIRA, F. A. R **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pementão, pimenta, beringela e jiló**. Ufla, 2003.

FLOR, HAROLD H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual review of phytopathology**,1971.

GAO, Y. *et al.* Effects of Ganopoly® (A *ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in Advanced-Stage cancer patients. **Immunological investigations**, 2003.

GIANNOPOLITIS, CONSTANTINE N., AND STANLEY K. RIES. "Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings." **Plant physiology** ,1977.

GŁOWACKI, S.; MACIOSZEK, V; KONONOWICZ, A. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 2011.

GU, L. *et al.* Production of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*: elicitation strategy and signal transduction. **Process Biochemistry**, 2018.

HASTOY, C. *et al.* First report of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* in France and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance. **Plant disease**, 2019.

HAVIR, EVELYN A., AND NEIL A. MCHALE. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology** ,1987.

HEATH, ROBERT L., AND LESTER PACKER. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation." **Archives of biochemistry and biophysics**, 1968.

HEIL, M., BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, 2002.

HELENO, S. A. *et al.* Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and chemical toxicology**, 2013.

HUIE, W.; DI, X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **Journal of Chromatography B**, 2004.

IMTIAJ, A; LEE, T. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World journal of agricultural sciences**, 2007.

JI, Zhe *et al.* Immunomodulation of RAW264. 7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007.

JOGAIAH, S. *et al.* Enhancement of downy mildew disease resistance in pearl millet by the G_app7 bioactive compound produced by *Ganoderma applanatum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2016.

JONES, J. B. *et al.* Compendium of tomato diseases. **American Phytopathological Society**, 1991.

JONES, J. DG; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, 2006.

KAMBLE, R.; VENKATA, S.; GUPTA, A. M. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* mycelia. **J Pure Appl Microbiol**, 2011.

KAPOORIA, R. G. Rare symptoms and conidial variation in *Septoria lycopersici* in Zambia. **Mycopathologia**, 1998.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, Willem J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in plant science**, 2019.

KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. **KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A**, 2005.

LI, Z.; LIU, J.; ZHAO, Y.. Possible mechanism underlying the antiherpetic activity of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2005.

LIU, R. *et al.* SA inhibits complex III activity to generate reactive oxygen species and thereby induces GA overproduction in *Ganoderma lucidum*. **Redox biology**, 2018.

LOPES, C. A. *et al.* Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p. 17-51, 2005.

LU, J., HE, R., SUN, P., ZHANG, F., LINHARDT, R. J., ZHANG .Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review." **International journal of biological macromolecules** , 2020.

MALNATI, W.D. Possibilidade de inclusão da resistência genética no controle da septoriose do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, 1993.

MANDAL, SAYANTI, SIVASUBRAMANIAN RAJARAMMOHAN, AND JAGREET KAUR. "ROS accumulation and associated cell death mediates susceptibility to *Alternaria brassicae* in *Arabidopsis* accessions." **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2019.

MARKET, Biopesticides. Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region-Global Forecast to 2025.© 2020.

MARKETS AND MARKETS.Biopesticides market by type (bioinsecticides, biofungicides, and bionematicides, source (microbials, plant extracts, and beneficial insects), mode of application, formulation, crop application and region—global forecast to 2023. 2019

MARURI-LÓPEZ, I. *et al.* Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. **Frontiers in Plant Science**, 2019.

MATSUNO, HIROSHI, AND IKUZO URITANI. "Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot." **Plant and Cell Physiology**, 1972.

MATTOS, A. D. P., TOLENTINO JÚNIOR, J. B., & ITAKO, A. T.. Determination of the severity of *Septoria* leaf spot in tomato by using digital images. **Australasian Plant Pathology**, 2020.

MESQUITA, G. L. *et al.* Foliar application of manganese increases sugarcane resistance to orange rust. **Plant Pathology**, 2019.

MOORE-LANDECKER, E. *et al.* Fundamentals of the fungi. Fundamentals of the fungi. 1972.

MORAES, W. B. *et al.* Aplicação foliar de fungicidas e produtos alternativos reduz a severidade do oídio do tomateiro. **Nucleus**, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2011.

MOURA D.R, YAMADA JK, DE ALBUQUERQUE LC, PONTES NC . Crop rotation reduces the density of volunteer plants in processing tomato fields and the inoculum of bacterial spot. **Eur J Plant Pathol**. 2020.

NAHATA, A. *Ganoderma lucidum*. A Potent Medicinal Mushroom with Numerous Health Benefits Pharmaceut **Anal Acta**, 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, 1981.

O'BRIEN, J. A., DAUDI.A, VERNON S. B., BOLWELL G. P. "Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism." **Planta** , 2012.

PANDEY, P. *et al.* Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Frontiers in plant Science**. 2017.

PATERSON, R. R. M. Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, 2006.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; DE CARVALHO, A. D. F. Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, curcubitáceas e cenoura. 2013.

QUAEDVLIEG, W. G. J. M. *et al.* Sizing up septoria. **Studies in mycology**, 2013.

QUEZADO-DUVAL, A; M. *et al.* Levantamento de doenças e mosca-branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil. 2013.

REIS, A; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. Mancha-de-septória: doença limitante do tomateiro no período de chuvas. **Embrapa Hortaliças**, 2006.

RESENDE, MÁRIO LÚCIO V., SÔNIA ML SALGADO, AND ZULEIDE M. CHAVES. "Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos." **Fitopatologia Brasileira**,2003.

ROSSI, S. *et al.* FAOSTAT estimates of greenhouse gas emissions from biomass and peat fires. **Climatic Change**, 2016.

RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLITS MG, MOLINA A, STEINER HY, HUNT MD. Systemic acquired resistance. **The plant cell**. 1996;

SAJEENA, A.; MARIMUTHU, T. Efficacy, stability and persistence of Ganosol, a Ganoderma based fungicide against plant pathogens. **The Journal of Plant Protection Sciences**, 2013.

SATRIA, D. *et al.* Lucidumol D, a new lanostane-type triterpene from fruiting bodies of Reishi (*Ganoderma lingzhi*). **Natural product research**, 2019.

SHAO, S. *et al.* Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2010.

SHI, W. *et al.* Extraction, characterization of the polysaccharide extracts from Se-enriched *G. lucidum* (Se-GLP) and its inhibition against oxidative damage in ischemic reperfusion mice. **Carbohydrate polymers**, 2010.

SRIDHAR S, SIVAPRAKASAM E, BALAKUMAR R, KAVITHA D. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. **World Journal of Science and Technology**.; 2011.

SHIRAHIGE, F.H. *et al.* Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. **Horticultura Brasileira**, 2010.

SIAH, A., C. DEWEER, F. DUyme, J. SANSSENÉ, R. DURAND, P. HALAMA, AND P. REIGNAULT. "Correlation of in planta endo-beta-1, 4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*." **Plant Pathology**. 2010.

SKALICKA-WOZNIAK, K. *et al.* Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 2012.

STADNIK, M. J., W. BETTIOL, AND M. L. SAITO. "Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew/Bioprospektion von pflanzlichen und pilzlichen Extrakten mit systemischem Effekt zur Bekämpfung des Echten Mehltaupilzes an Gurken." *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*/**Journal of Plant Diseases and Protection**, 2003.

STEVENSON, W. R. Septoria leaf spot. In: JONES, J. B.; ZITTER, T. A.; MOMOL, T. M.; MILLER, S. A. (Ed). **Compendium of Tomato Diseases and Pests**., 2014.

STRACK, D. "10—Phenolic metabolism." **Academic Press: London, UK**, 1997.

TAIZ, L. *et al.* **Fundamentos de Fisiologia Vegetal-6**. Artmed Editora, 2021.

TAIZ, L., ZEIGER., E. "Metabólitos secundários e defesa vegetal." *Fisiologia vegetal* 4 (2004).

TAIZ, L. *et al.* **Fundamentos de Fisiologia Vegetal-6**. Artmed Editora, 2021.

TANG, Y; ZHONG, J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002.

TANG, y; ZHONG, J.. Scale-Up of a Liquid Static Culture Process for Hyperproduction of Ganoderic Acid by the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology progress**, . 2003.

TORRES, M. A.; JONES, J. D.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant physiology**, 2006.

URBEN, A. F.; OLIVIERA, H. C. B.; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, A. H. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília Embrapa, 151p, 2017.

URBEN, Arailde Fontes. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Desenvolvimento, 2004.

VAN DER HEM, L. G. *et al.* Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. Transplantation. 1995.

VOGT, THOMAS. "Phenylpropanoid biosynthesis." **Molecular plant**, 2010.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, 2013.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Aplicação prática da resistência induzida a doenças de plantas: uma avaliação da eficácia em condições de campo. **The Journal of Agricultural Science**, 2009.

WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I., Ab KADIR, S., SAARI, N. . The morphology of *Ganoderma lucidum* mycelium in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production. **Biotechnology Reports**, 2016.

WANG, H. *et al.* An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties. **Current medicinal chemistry**, 2013.

WANG, H.; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, 2006.

WANG, J. *et al.* Immunomodulatory of selenium nano-particles decorated by sulfated *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Food and chemical toxicology**, 2014.

WASSER, WEIS. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. **International Journal of medicinal mushrooms**, 1999.

WIESEL, L. *et al.* Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. **Frontiers in plant science**, 2014.

WILDERMUTH, M. C., DEWDNEY, J., GANG W, FREDERICK M. A. "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." **Nature**, 2001.

WU, Y.; WANG, D;. A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. **Journal of proteome research**, 2009.

YANG, X. *et al.* A polysaccharide of *ganoderma lucidum* enhances antifungal activity of chemical fungicides against soil-borne diseases of wheat and maize by induced resistance. **Agriculture**, 2022.

YUEN, J. WM; GOHEL, M. D. I. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. **Nutrition and cancer**, 2005.

ZAMBOLIN, L.; V, F.X.R.; COSTA, H. (eds). Controle de doenças de plantas de hortaliças. **Viçosa, UFV**. 2000.

ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Mol. Plant**, 2010.

ZHANG, Z. *et al.* Use of *Ganoderma Lucidum* polysaccharide to control fusarium cotton wilt, and the mechanism involved. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2019.

ZHU, L. W.; ZHONG, J. J.; TANG, Y. J. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, 2008.

ZIPFEL, C.; OLDROYD, G. E. Plant signalling in symbiosis and immunity. **Nature**, 2017.

ZIEGENBEIN, F. C; HANSEN, H.P; KÖNIG, W. A. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. **Phytochemistry**, 2006.