

Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*

Ricardo José Domingues¹, Maria Cláudia Marx Young², Jesus Guerino Töfoli¹, Dácio Roberto Matheus³

¹ APTA / Instituto Biológico, CPDSV, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252. CEP.: 04014-002, São Paulo, SP; ² Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, São Paulo, SP; ³ Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia, São Paulo, SP.

Autor para correspondência: Ricardo José Domingues (domingues@biologico.sp.gov.br)

Data de chegada: 01/07/2009. Aceito para publicação em: 03/06/2011.

1662

RESUMO

Domingues, R.J.; Young, M.C. M.; Töfoli, J.G.; Matheus, D.R. Avaliação do potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.3, p.149-151, 2011.

O emprego de fungicidas na agricultura, principalmente quando utilizados de forma inadequada, tem provocado danos tanto ao homem como ao ambiente. O presente trabalho teve por objetivo o estudo *in vitro* da eficácia de extratos de três plantas e de dois basidiomicetos nativos do Brasil no controle dos fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum*, causadores de graves prejuízos às culturas de tomate e morango, respectivamente, além de *Sclerotium rolfsii*, considerado como patógeno polífago. No trabalho foram avaliados: a) a inibição de crescimento micelial dos três fitopatógenos, b) inibição da germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e c) inibição da

germinação de escleródios de *S. rolfsii*. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato de *Oudemansiella canarii*, que proporcionou os menores valores de crescimento micelial dos três patógenos, além inibir totalmente a germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e de escleródios de *S. rolfsii*. O extrato de *Irpex lacteus* inibiu parcialmente o crescimento micelial dos patógenos estudados e o extrato de *Avicennia schaueriana* promoveu apenas 16 % de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii*. Nenhum efeito sobre os patógenos foi verificado com os extratos de *Senna spectabilis* e *Senna multijuga* nas condições em que foram realizados os experimentos.

Palavras-chave adicionais: *Avicennia schaueriana*, *Senna spectabilis*, *Senna multijuga*, *Irpex lacteus*, *Oudemansiella canarii*, produtos naturais.

ABSTRACT

Domingues, R.J.; Young, M.C.M.; Töfoli, J.G.; Matheus, D.R. Antifungal potential of extracts of native plants and basidiomycetes on *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.3, p.149-151, 2011.

The use of fungicides in agriculture, especially when inadequate, has caused damages to both the environment and humans. The present study aimed to investigate *in vitro* the efficacy of extracts of three plants and two basidiomycetes of the Brazilian flora in controlling *Alternaria solani* and *Colletotrichum acutatum*, which causes serious damages to tomato and strawberry crops, respectively, and *Sclerotium rolfsii*, considered as non-specific pathogen. This work evaluated: a) mycelial growth inhibition for the three phytopathogens, b) conidial germination inhibition (*A. solani* and *C. acutatum*) and c) sclerotial

germination inhibition for *S. rolfsii*. The best results were obtained with *Oudemansiella canarii* extract, which provided the lowest mycelial growth values for the three pathogens, besides totally inhibiting *A. solani* and *C. acutatum* conidial germination and *S. rolfsii* sclerotial germination. *I. lacteus* extract partially inhibited the mycelial growth of the pathogens and *Avicennia schaueriana* promoted only 16% inhibition in *S. rolfsii* mycelial growth. *Senna spectabilis* and *Senna multijuga* extracts had no effect on the pathogens under the conditions of the present experiments.

Keywords: *Avicennia schaueriana*, *Senna spectabilis*, *Senna multijuga*, *Irpex lacteus*, *Oudemansiella canarii*, natural products.

A flora brasileira é considerada a mais rica do mundo com cerca de 56.000 espécies de plantas (5) e entre 12,5 e 13,5 mil espécies de fungos (8). No entanto, com exceção de espécies de importância medicinal, muito pouco conhecemos a respeito da composição química de 99,6 % das espécies de plantas nacionais.

Diversos metabólitos secundários produzidos pelas plantas possuem funções de defesa contra herbívoros, pragas e patógenos (3). Moléculas complexas como terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. Tais substâncias são consideradas como produtos naturais e representam

uma fonte alternativa quase inesgotável de novas moléculas com potencial para serem utilizados no controle químico de doenças.

Alternaria solani (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc. são fungos fitopatogênicos capazes de provocar danos severos a espécies olerícolas de grande importância econômica. *A. solani*, agente causal da doença conhecida como “pinta preta” está entre os principais patógenos de folhas, hastes e frutos do tomateiro (1). A “flor preta”, causada por *C. acutatum*, é considerada o principal problema fitossanitário da cultura do morangueiro, podendo infectar flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e parte superior do rizoma (10). *S. rolfsii* é um organismo que faz parte da microbiota do

solo. É considerado patógeno causador de podridão de raiz e colo, podendo atacar diversas espécies de plantas em todos os seus estádios de desenvolvimento (1).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial dos extratos de três espécies de plantas e duas espécies de basidiomicetos nativos na inibição *in vitro* do crescimento micelial e das estruturas reprodutivas e/ou de sobrevivência de *A. solani*, *C. acutatum* e *S. rolfisii*.

As culturas dos fungos *Oudemansiella canarii* (CCB179) e *Irpex lacteus* (CCB196) foram fornecidas pela Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente-SP). Os extratos das plantas fanerógamas nativas *Senna spectabilis*, *Senna multijuga* e *Avicennia schaueriana* foram fornecidos pela extratoteca da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do mesmo Instituto e os três patógenos foram isolados de amostras apresentando sintomas coletadas em plantios comerciais de Piedade, SP e mantidos na micoteca do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico.

Os extratos de *O. canarii* e *I. lacteus* foram elaborados utilizando-se metodologia modificada a partir da empregada por Rosa et al. (9) e foram armazenados a -10 °C até a realização dos ensaios. Os extratos etanólicos de flores de *S. spectabilis* e folhas de *S. multijuga*, foram obtidos a partir da secagem e moagem do material e, em seguida, da extração utilizando-se um aparelho modelo ASE 300 – Accelerated Solvent Extractor. Os extratos etanólicos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotatório. Com o extrato parcialmente concentrado, a amostra foi distribuída em frascos de 5 mL e seca em banho-maria a 60 °C por 72 horas.

O extrato clorofórmico de *A. schaueriana* foi obtido macerando o pó seco das folhas em álcool etílico em temperatura ambiente. Após filtração, a solução etanólica foi concentrada em evaporador rotatório, levada ao banho-maria a 60 °C para obtenção do resíduo etanólico. Em seguida, o resíduo foi redissolvido com metanol+água destilada e particionado com hexano. A fração hexânica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório. À fração hidrometanólica foi adicionada água destilada e depois particionada com clorofórmio, originando o resíduo clorofórmico após a eliminação do solvente.

A avaliação do efeito dos extratos sobre o crescimento micelial dos patógenos foi feita através da diluição em meio de cultura BDA. Os extratos vegetais e fúngicos foram dissolvidos previamente em acetona e dimetil sulfoxido, respectivamente. A seguir, foram adicionados ao BDA nas concentrações de 0 e 1000 mg.mL⁻¹ e vertidos em placas de Petri (5 cm Ø). Discos de BDA com micélio dos patógenos foram transferidos para as placas e incubados em BOD a 25 °C em ausência

de luz. A avaliação foi realizada quando as parcelas testemunhas foram completamente tomadas pelos fungos, medindo-se o crescimento radial dos fungos em dois sentidos.

Para a avaliação do efeito dos extratos sobre a inibição da germinação de conídios de *C. acutatum* e *A. solani*, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly (7). Os extratos vegetais e fúngicos foram dissolvidos previamente em acetona e dimetil sulfoxido, respectivamente. Discos de papel celofane foram colocados em placas de Petri sobre discos de papel de filtro embebidos com a solução de cada extrato nas concentrações 0 e 1000 mg.mL⁻¹. A seguir, uma gota de suspensão de conídios de *A. solani*, e *C. acutatum*, na concentração de 10⁴ conídios.mL⁻¹ foi depositada sobre cada disco de celofane. As placas foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12 h e 25 °C. A avaliação de germinação dos conídios foi feita transferindo-se os discos de celofane para uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma pinça, sobre a qual foram colocadas uma gota de água e uma lamínula. A observação foi feita em microscópio óptico após 16 h de incubação contando-se de 100 conídios e considerando-se como germinados, os que apresentassem indício de formação do tubo germinativo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri com 10 discos de celofane.

O efeito dos extratos sobre a germinação de escleródios de *S. rolfisii* foi estudado depositando-se dez escleródios em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e cada um dos extratos, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial já descrito e incubadas por 72 h a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada parcela sendo composta por 10 placas por extrato contendo 10 escleródios cada. A avaliação foi feita contando-se os escleródios germinados e calculando-se a porcentagem de germinação.

Em todos os experimentos, tratamentos contendo dimetil sulfoxido, acetona e extrato de meio de cultura MEC (extrato de malte a 2 %, pepton a 0,1 % e glicose a 1,5 %) foram utilizados como controle negativo.

Considerando-se os valores de inibição do crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. rolfisii* expressos na Tabela 1, pode-se concluir que os extratos dos dois basidiomicetos foram mais eficientes do que os extratos vegetais. *O. canarii* foi o que proporcionou os melhores resultados atingindo a média de 84 % de inibição do crescimento micelial, além de não permitir a germinação de escleródios. A porcentagem de inibição pelo extrato de *I. lacteus* foi inferior ao de *O. canarii*, mas foi mais eficiente que os demais extratos. Dentre os

Tabela 1 – Crescimento micelial (diâmetro em cm), porcentagem de inibição do crescimento micelial e porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium rolfisii* e de conídios de *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum* quando submetidos à ação de extratos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, em relação à testemunha.

Origem dos extratos	<i>Sclerotium rolfisii</i>			<i>Alternaria solani</i>			<i>Colletotrichum acutatum</i>		
	Diâm. (cm)	Inibição (%)	Germ. de escleródios (%)	Diâm. (cm)	Inibição (%)	Germ. de escleródios (%)	Diâm. (cm)	Inibição (%)	Germ. de escleródios (%)
<i>Irpex lacteus</i>	2,7 c ¹	46,7	67,0 b ¹	3,4 b ¹	31,3	100,0	2,5 b ¹	50,0	64,7 b ¹
<i>Oudemansiella canarii</i>	0,9 d	84,0	0,0 c	1,5 c	69,3	0,0	0,8 c	83,3	0,0 e
<i>Avicennia schaueriana</i>	4,2 b	16,0	100,0 a	5,0 a	0,0	100,0	5,0 a	0,0	86,1 a
<i>Senna spectabilis</i>	5,0 a	0,0	100,0 a	5,0 a	0,0	100,0	5,0 a	0,0	53,6 c
<i>Senna multijuga</i>	5,0 a	0,0	100,0 a	5,0 a	0,0	100,0	5,0 a	0,0	63,2 bc
Testemunha	5,0 a	“	100,0 a	5,0 a	“	100,0	5,0 a	“	30,4 d
CV (%)	2,7		5,0	0,8			1,7		7,6

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

extratos de plantas o que mais se destacou foi o de *A. schaueriana* com 16 % de inibição do crescimento micelial, sendo semelhante aos de *S. spectabilis* e *S. multijuga* quanto à germinação de escleródios.

Para *A. solani* os resultados foram semelhantes aos obtidos com *S. rolfsii*, com redução do crescimento micelial pelo extrato de *O. canarii*, sendo estatisticamente mais eficiente que os demais. O extrato de *I. lacteus* proporcionou nível intermediário de inibição, com crescimento menor em relação aos extratos vegetais, os quais não diferiram da testemunha. Apenas o extrato de *O. canarii* não permitiu a germinação de conídios de *A. solani*. Os outros extratos não apresentaram nenhum grau de inibição.

O extrato de *O. canarii* foi o que proporcionou maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. acutatum*. A inibição do crescimento pelo extrato de *I. lacteus* foi estatisticamente superior aos extratos vegetais atingindo 50,0 %. *A. schaueriana*, *S. spectabilis* e *S. multijuga* não apresentaram ação sobre os patógenos. O extrato *O. canarii* foi o único a não permitir a germinação de conídios de *C. acutatum*.

A ação antimicrobiana de metabólitos de *Oudemansiella* foi descrita pela primeira vez por Anke et al. (2), a partir de estudos com *O. mucida*. Os autores relataram que quanto à estrutura molecular, a substância ativa que foi isolada (oudemansina), mostrou-se semelhante a estrobilurina A (C₁₆H₁₈O₃) a qual, depois de muitos anos de pesquisa originou o grupo de fungicidas denominado estrobilurinas. Tais fungicidas apresentam como mecanismo de ação característico, a interferência na respiração mitocondrial, bloqueando assim, a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1, através da inibição da óxido-redutase de ubihidroquinona-citocromo c. *O. canarii* provavelmente também produz oudemansina, o que explicaria o excelente desempenho verificado.

A ação fungicida de *I. lacteus* já foi relatada por outros autores. Koitabashi & Tsushima (6) incubando folhas de trigo inoculadas com *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, agente causal do oídio do trigo, na presença de *I. lacteus* sem que houvesse contato entre eles, verificaram alta inibição do patógeno por dois tipos de compostos voláteis: 5-pentil-2-furaldeído e 5-(4-pentenil)-2-furaldeído. Também verificaram o efeito supressivo destes compostos sobre *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp..

A indução da germinação de conídios de *C. acutatum* observada com os extratos vegetais e de *I. lacteus*, já foi verificada por Bonaldo & Pascholati (4) com *Colletotrichum sublineolum* e *C. lagenarium*, quando utilizou frações purificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Este efeito pode ser explicado pela presença nos extratos de substâncias estimuladoras, de nutrientes ou pela inativação da micosporina-alanina, um auto inibidor presente na mucilagem que envolve os conídios.

Tais resultados reforçam a importância dos fungos basidiomicetos e de plantas fanerógamas da flora nacional, como fontes de substâncias com elevada ação antifúngica sobre fitopatógenos, justificando a necessidade urgente da preservação dos ecossistemas em que vivem enquanto são melhor estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G. N. **Plant pathology**. 5^a ed. San Diego: Academic Press. 2005. 922 p.
2. Anke, T.; Hecht, H.J.; Schramm, G.; Steglich, W. Antibiotics from basidiomycetes. IX Oudemansin, an antifungal antibiotic from *Oudemansiella mucida* (Schader ex Fr.) Hoenel (Agaricales). **The Journal of Antibiotics**, Tokio, v.32, n.11, p.1112-1117, 1979.
3. Bennett, R.N.; Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Philadelphia, v.4, n.127, p.617-633. 1994.
4. Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F. Efeito de frações purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.233-238, 2007.
5. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estudos da representatividade ecológica nos biomas brasileiros**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/estudos.htm>>. Acesso em: 7 dez. 2007.
6. Koitabashi, M.; Tsushima, S. Studies of biocontrol of air-borne plant disease by a filamentous fungus producing antifungal volatiles. **Japan Agricultural Research Quarterly**: Tokyo, v.41, n.4, p.261-265, 2007.
7. Nelly, D. **Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematocides and bactericides**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1978. 140 p.
8. Peixoto, A.L.; Morim, M.P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.55, n.3, p.21-24, 2007. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 out. 2008.
9. Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C.; Capelari, M.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.7, p.967-974, 2003.
10. Tanaka, M. A. S.; Betti, J. A.; Kimati, H. Doenças do morangueiro-*Fragaria x ananassa* Duch. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Rezende, J. A.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.489-499.