

NOTAS CIENTÍFICAS

Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *in vitro*

Ana Cristina Grade Fiori-Tutida¹, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada¹, José Renato Stangarlin², Sérgio Florentino Pascholati³

¹Departamento de Agronomia, UEM/PR, CEP 87020-900, Maringá-PR; ²Departamento de Agronomia, UNIOESTE/PR, Mal. Cândido Rondon-PR; ³Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP, Caixa Postal 09, 13418-900, Piracicaba-SP, e-mail: acgfiori@yahoo.com

*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Autor para correspondência: Kátia R. F. Schwan-Estrada

Data de chegada: 08/10/2003. Aceito para publicação em: 09/11/2006.

0998

RESUMO

Fiori-Tutida, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Pascholati, S.F. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *in vitro*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.287-289, 2007.

Com o objetivo de buscar medidas alternativas para o controle de *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* testou-se o efeito fungitóxico *in vitro* dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre esses fungos. Os extratos brutos aquosos de ambos os cogumelos não tiveram efeito significativo tanto no

crescimento micelial quanto na germinação de esporos de *B. sorokiniana*. Por outro lado, os extratos dos cogumelos inibiram a germinação de esporos de *P. recondita* f. sp. *tritici*, com destaque para o isolado LE 96/17 de *L. edodes* que apresentou inibição da ordem de 52,4%.

Palavras-chave adicionais: atividade fungitóxica, cogumelos comestíveis, controle alternativo.

ABSTRACT

Fiori-Tutida, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Pascholati, S.F. Extracts of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Bipolaris sorokiniana* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *in vitro*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.287-289, 2007.

With the purpose of finding alternative ways to control *Bipolaris sorokiniana* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, the fungitoxic effect *in vitro* of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* mushrooms was tested on these fungi. The aqueous crude extract of both mushrooms did not have significant effect on mycelial

growth and spore germination of *B. sorokiniana*. On the other hand, the mushroom extracts inhibited the germination of *P. recondita* f. sp. *tritici* uredospores, particularly on the *L. edodes* (96/17), which exhibited the largest inhibition of spore germination (52,38%).

Additional keywords: fungitoxic activity, edible mushrooms, alternative control.

Entre as principais doenças fúngicas da cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) Thell., destaca-se a mancha marrom causada pelo fungo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib). Drechs. Ex. Dastur, anamorfo: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorok.) Schoem. e a Ferrugem da folha, causada por *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* (syns. *P. rubigovera* (DC). Wint., *P. triticina* Eriks.) (9).

Os fungicidas, juntamente com a adoção de cultivares resistentes, têm sido os recursos mais utilizados para o controle destas doenças. Entretanto, as constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos profissionais à pesquisa de métodos alternativos de controle de fitopatógenos.

A importância de cogumelos, como Shiitake (*Lentinula edodes*) e Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*), no mercado mundial é atribuída não apenas ao seu valor nutricional, mas também às possíveis aplicações na área médica, industrial e mais recentemente, na área

agrícola. Os filtrados de basidiocarpo, píleo, estipe, bem como filtrados provenientes do crescimento micelial de *L. edodes* apresentaram substâncias com atividade antibiótica *in vitro* para os fitopatógenos *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum sublineolum* e *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora* (8). Da mesma forma, o fluido de cultura (sem micélio) apresentou atividade bacteriostática, quando testado contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium* (5).

Em vista do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fungitóxico *in vitro* dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* sobre os fungos fitopatogênicos *B. sorokiniana* e *P. recondita* f. sp. *tritici*.

B. sorokiniana foi obtido a partir de sementes de trigo, variedade IAPAR 53, e o seu isolamento foi realizado através da técnica do papel de filtro com congelamento (1). O isolado foi mantido em meio de cultura BDA à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os esporos de *P.*

recondita f. sp. *tritici* foram coletados a partir de plantas de trigo, naturalmente infectadas, que apresentavam sintomas característicos da doença.

Para a obtenção dos extratos brutos dos cogumelos, amostras de *L. edodes* (isolados LE 95/01 e LE 96/17) e de *A. blazei* (ABL 29/99), provenientes de basidiocarpos abertos e fechados, na forma de pó seco, foram cedidas pela Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Botucatu (UNESP). O preparo dos Extratos Brutos (EBs) consistiu na hidratação do pó seco por 24 h à temperatura de 4°C, na proporção de 14 mL de água destilada: 1 g de pó seco de basidiocarpo. As amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº1, sendo em seguida centrifugadas a 20.000g, à temperatura de 4°C, durante 20 min. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a uma filtragem de esterilização em sistema Milipore com membrana de 0,22 µm, em câmara de fluxo laminar.

Para avaliar o efeito dos cogumelos no crescimento micelial de *B. sorokiniana*, adicionaram-se alíquotas de EB de *A. blazei* (ABL 29/99) em erlenmeyers contendo 100 mL de BDA e alíquotas de *L. edodes* (LE 95/01 e LE 96/17) de modo a se obter concentrações finais de 100, 1.000, 10.000, 20.000 e 40.000 ppm. Em seguida, este material foi autoclavado à temperatura de 121 °C e 1 atm, durante 20 min. Após o resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri e um disco de micélio (0,6 cm) de *B. sorokiniana*, retirado de uma colônia com 10 dias de idade, foi repicado para o centro das placas, incubadas em BOD à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Como testemunha utilizou-se somente o BDA. Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial, medindo-se o diâmetro das colônias até o momento em que a testemunha atingisse 2/3 da placa.

Para avaliar o efeito dos cogumelos sobre a germinação de esporos de *B. sorokiniana*, alíquotas de 1.000 µL dos EBs nas concentrações anteriormente citadas + 1.000 µL da suspensão de esporos de *B. sorokiniana* (1 x 10⁷ conídios/mL), obtidos de uma cultura monospórica com 15 dias de idade, foram distribuídas na superfície de placas de Petri, sendo estas mantidas em BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Como testemunha

utilizou-se água destilada esterilizada em substituição aos EBs.

Após 4 horas, adicionou-se uma alíquota de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada placa, a fim de paralisar a germinação de esporos. Foi utilizada uma placa por tratamento, sendo esta subdividida em 3 partes e contados 100 esporos/parte, num total de 300 esporos por tratamento.

Para o teste de germinação de esporos de *P. recondita* f. sp. *tritici*, os EBs, após filtragem em papel de filtro Whatman nº1, foram centrifugados a 20.000g, à temperatura de 4°C, durante 20 min. Os sobrenadantes coletados foram submetidos à filtragem de esterilização (conforme descrito anteriormente). Em seguida, alíquotas de 1000 µL dos EBs nas mesmas concentrações anteriores + 1000 µL da suspensão de esporos de *P. recondita* f. sp. *tritici* (1 x 10⁴ uredósporos/mL) foram distribuídas na superfície do meio Agar-Água 2% com auxílio da alça de Drigalski. À suspensão de esporos (1 x 10⁴ uredósporos/mL) foram adicionados 100 µL de Tween 80. As placas foram mantidas em BOD à temperatura de 23 °C e escuro. Como testemunha utilizou-se água destilada esterilizada em substituição aos EBs + Tween 80. Após 24 horas, adicionou-se uma alíquota de 100 µL de lactofenol com azul de algodão em cada placa, a fim de paralisar a germinação dos esporos. Foram utilizadas três repetições, sendo contados 100 esporos/repetição. Os valores obtidos para a germinação de esporos foram transformados em percentagem de inibição da germinação de esporos (PIG).

Para análise estatística utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições e 21 tratamentos, com esquema fatorial 4 x 5 +1. As médias dos fatores qualitativos (extratos) foram comparadas pelo teste Tukey (P < 0,05) e os tratamentos foram comparados à testemunha pelo teste Dunnett (P £< 0,05).

Os isolados de *L. edodes* (LE 96/17 e LE 95/01) não apresentaram efeito antagônico *in vitro* sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *B. sorokiniana* quando estes foram empregados nas concentrações testadas. Ao contrário, de uma maneira geral, foi observado um estímulo, embora não estatisticamente diferente da testemunha, em ambas as variáveis

Tabela 1. Efeito do extrato bruto de isolados de *L. edodes* e *A. blazei* no crescimento micelial (CM) e no número de esporos germinados (EG) de *B. sorokiniana*, e na inibição da germinação (IG) de uredósporos de *P.recondita* f. sp. *tritici*.

Extratos	Concentrações (ppm)														
	100			1.000			10.000			20.000			40.000		
	CM (cm)	IG (%)	EG (n°)	CM (cm)	IG (%)	EG (n°)	CM (cm)	IG (%)	EG (n°)	CM (cm)	IG (%)	EG (n°)	CM (cm)	IG (%)	EG (n°)
LE 95/01	3,81 ^{ns}	20,5b ⁽⁺⁾	50,7a ^{ns}	4,46a ^{ns}	45,0a ⁽⁺⁾	62,7b ^{ns}	4,50a ^{ns}	29,2b ⁽⁺⁾	2,7ab ^{ns}	5,05a ^{ns}	43,9a ⁽⁺⁾	95,0a ^{ns}	4,28ab ^{ns}	35,2a ⁽⁺⁾	88,7a ^{ns}
LE 96/17	3,98a ^{ns}	8,42b ^{ns}	57,0a ^{ns}	3,96a ^{ns}	52,4a ⁽⁺⁾	64,7b ^{ns}	4,00a ^{ns}	7,6a ⁽⁺⁾	6,3ab ^{ns}	4,61a ^{ns}	42,4a ⁽⁺⁾	9,3ab ^{ns}	5,07a ^{ns}	25,6a ⁽⁺⁾	92,3a ^{ns}
ABL 29/99 (BA)	3,31a ^{ns}	21,3b ⁽⁺⁾	61,0a ^{ns}	3,75a ^{ns}	45,0a ⁽⁺⁾	88,0a ^{ns}	3,76a ^{ns}	13,9c ^{ns}	88,7a ^{ns}	3,67a ^{ns}	39,6a ⁽⁺⁾	90,0ab ^{ns}	3,21b ^{ns}	39,5a ⁽⁺⁾	89,7a ^{ns}
ABL 29/99 (BF)	4,12a ^{ns}	31,6a ⁽⁺⁾	53,3a ^{ns}	5,03a ^{ns}	28,6b ⁽⁺⁾	62,0b ^{ns}	3,65a ^{ns}	41,2ab ⁽⁺⁾	74,0b ^{ns}	3,55a ^{ns}	48,7a ⁽⁺⁾	78,0b ^{ns}	3,51ab ^{ns}	35,1a ⁽⁺⁾	85,3a ^{ns}
Controle	4,03	0,00	80,3												

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas por (+) diferem do controle e são estatisticamente superiores, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Médias seguidas por (ns) não diferem dos respectivos controles, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

BF – basidiocarpo fechado; BA – basidiocarpo aberto

a partir da concentração de 1.000 ppm. Uma das causas prováveis para esta variabilidade apresentada pode ser atribuída à composição nutricional dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, caracterizados por serem muito ricos em açúcares, carboidratos e proteínas, os quais estariam atuando como fonte nutricional para o patógeno em questão (3). Blakeman & Fokkema (2) verificaram que, em ambientes onde há uma maior disponibilidade de nutrientes, há um estímulo dos processos de germinação e esporulação dos microrganismos.

Apesar dos resultados negativos em termos de fungitoxicidade por parte dos cogumelos neste experimento, a atividade antimicrobiana dos mesmos, já foi verificada por vários autores (4,7). A baixa concentração dos extratos utilizada no experimento (100 a 40.000 ppm, equivalente a 0,01% - 4%) também pode ter favorecido para que os cogumelos não revelassem todo seu potencial fungitóxico ao patógeno em estudo, pois quando Sasaki et al. (10) incorporaram ao meio BDA, a proporção de 10, 20 e 30% de extrato de *L. edodes*, verificaram que o mesmo apresentou um efeito antagônico sobre os fungos *Helminthosporium euphorbia*, *Helminthosporium* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis sojae*. Somente na concentração de 40.000 ppm pôde-se observar diferenças significativas, pelo teste Tukey, entre os diferentes extratos, com destaque para o isolado de *A. blazei* 29/99 (basidiocarpo aberto e fechado), os quais não diferiram significativamente entre si. Com relação à inibição da germinação de esporos de *P. recondita* f. sp. *tritici*, valores de inibição da ordem de 52,38% foram verificados quando se utilizou o EB de LE 96/17, na concentração de 1.000 ppm. Tais resultados diferem dos encontrados por Piccinin (8) ao verificar que tanto o filtrado de pileo, como o filtrado de estipe de *L. edodes* apresentaram efeito inibitório da esporulação de *Exserohilum turcicum* em concentrações superiores a 10.000 ppm. Estas diferenças de comportamento entre *B. sorokiniana* e *P. recondita* f. sp. *tritici* no tocante à germinação de esporos, talvez possam ser explicadas pela maior ou menor sensibilidade dos patógenos aos diferentes EBs, uma vez que se tratam de patógenos necrotróficos e biotróficos, respectivamente e, conseqüentemente diferentes em relação aos seus ciclos de vida. Apesar de não apresentar fungitoxicidade a *B. sorokiniana*, a falta de atividade dos EBs em relação ao patógeno é interessante no tocante à utilização do extrato destes cogumelos como prováveis

indutores de resistência em plantas, pois segundo Kessmann et al. (6), para que uma molécula química seja considerada um ativador de respostas de resistência, esta deve induzi-la na mesma magnitude que os patógenos compatíveis, levando à expressão dos mesmos marcadores bioquímicos que os do modelo biológico, além de não apresentar atividade antimicrobiana direta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral, H.M. do. Teste de sanidade de sementes de arroz. In: Soave, J.; Wetzel, M.M. da S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.358-370.
2. Blakeman, J.P.; Fokkema, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-190, 1982.
3. Chang, R. Functional properties of edible mushrooms. Disponível em: <http://www.meridianmedical.org/aboutus/raymond_articles_01.htm>. Acesso em: 03 set. 2003.
4. Del Signore, A.; Romeo, F.; Giaccio, M. Content of phenolic substances in basidiomycetes. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.5, p.552-556, 1997.
5. Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Londres, v.17, n.1, p.71-74, 2001.
6. Kessmann, H.; Staub, T.; Hoffmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, J.; Ward, E.; Uknes, S. Ryals, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n.32, p.439-459, 1994.
7. Pacumbaba, R.P.; Beyl, C.A.; Pacumbaba Jr, R.O. Shiitake mycelial leachate suppress growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease**, St. Paul, n.83, p.20-23, 1999.
8. Piccinin, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível "shiitake" (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. 2000. 124f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
9. Reis, E.M.; Casa, R.T.; Forcelinin, C.A. Doenças do trigo. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Ed.) Manual de fitopatologia. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. v.2, p.725-735.
10. Sasaki, S.H.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C.M.; Montalván, R.; Pacchola-Meirelles, L. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n.32, p.52-55, 2001.