



*UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS- UEA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO- PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA -MBT*

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DOS EXTRATOS DE BASIDIOMICETOS FRENTE À
FITOPATÓGENOS PREJUDICIAIS À PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS DE
PEQUENOS PRODUTORES DA REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

ADRYA DA SILVA FIGUEIREDO

Parintins

2012



*UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS- UEA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO- PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA-MBT*

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DOS EXTRATOS DE BASIDIOMICETOS FRENTE À
FITOPATÓGENOS PREJUDICIAIS À PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS DE
PEQUENOS PRODUTORES DA REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, sob orientação do professor Dr. Ademir Castro e Silva.

ADRYA DA SILVA FIGUEIREDO

Parintins

2012

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Adrya da Silva Figueiredo, sob o título “Avaliação “*in vitro*” dos extratos de basidiomicetos frente à de fitopatógenos prejudiciais à produção de hortaliças de pequenos produtores da região do baixo Amazonas (AM)” para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros são de parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Parintins, 20 de abril 2012

Banca Examinadora:

Dr. Ademir Castro e Silva

Dra. Milade dos Santos Carneiro Cordeiro

Dra. Arelis Abalos Rodrigues

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Alexandre, por toda ajuda, companheirismo e paciência, no desenvolvimento do meu trabalho, e ao meu filho Grigórios, que esteve comigo na construção desta obra, dentro e fora de meu ventre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, em especial:

Universidade do Estado do Amazonas, por meio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais-MBT, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

Ao professor, Dr. Ademir Castro e Silva, pela orientação, paciência, confiança e incentivo durante todo o período de realização dos trabalhos de pesquisa e elaboração desta dissertação.

A todos os professores do Programa de Biotecnologia e Recursos Naturais, pela sabedoria e eficiência em seus ensinamentos.

A Universidade Federal do Amazonas, em especial ao professor Luiz Queiroz, que auxiliou na identificação do *Fusarium* sp.

As colegas de curso, pessoas competentes e dedicadas, sempre dispostas a ajudar. Em especial, Paula Mara, pela amizade e parceria durante esta caminhada.

Aos alunos de graduação Elerson e Katake pela colaboração e companheirismo nos trabalhos.

A bioquímica Cintia Portela, pela disposição em ajudar sempre que solicitada.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, apoio fundamental à execução deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e motivação em todos os momentos, principalmente a minha amada avó Terezinha.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim desta obra.

Aos Professores da banca, pela dedicação, compreensão, análise e recomendações para o aperfeiçoamento e melhorias deste trabalho.

RESUMO

Os métodos utilizados no controle de doenças de plantas vêm sendo aperfeiçoados com objetivo de assegurar o uso correto e racional de produtos químicos, bem como, garantir a rentabilidade da atividade ao agricultor e diminuir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, o controle biológico se constitui em demanda atual e de alta importância para viabilizar a substituição dos agroquímicos. As constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos pesquisadores a investigar algumas alternativas visando redução do uso de fungicidas com resultados promissores no controle de fitopatógenos em diversas culturas. O uso de extratos de microrganismos e produtos oriundos do seu metabolismo é uma prática que vem sendo bastante pesquisada em alguns patossistemas. Os fungos vêm sendo citados com elevado potencial antifúngico, por isso neste trabalho estudou-se extratos aquosos (quente, frio e ultrassônico) e hidroalcolólico (quente e frio) dos basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus*, no controle de fitopatógeno, onde comprovou-se que os extratos tiveram efeito significativo tanto na inibição do crescimento micelial, quanto na germinação de conídios e escleródios.

ABSTRACT

The methods used to control plant diseases have been improved in order to ensure the correct and rational use of chemicals, as well as ensure the profitability of the farmer and reduce risks to human health and the environment. Thus, biological control is in current demand and is of high importance to enable the replacement of agrochemicals. The constant concern for the environment and human health have led many researchers to investigate some alternatives aimed at reducing the use of fungicides with promising results in control of plant pathogens in several crops. The use of extracts from micro-organisms and products of their metabolism is a practice that has been extensively researched in some pathosystems. Fungi have been cited with high antifungal activity, so this work we studied aqueous extracts (hot, cold and ultrasound) and hydroalcoholic (hot and cold) and the basidiomycete *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus crinitus* in pathogen control, where it was shown that the extracts have significant effect on the inhibition of mycelial growth, and germination of conidia and sclerotia.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II:

Tabela 1	Media do crescimento micelial (cm) de <i>Fusarium</i> sp., contendo meio de cultura BDA + extratos de basidiomicetos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	53
Tabela 2	Equações de regressão para percentagem de germinação em função das concentrações. -----	57
Tabela 3	Percentual de germinação dos escleródios, em relação à testemunha, de <i>Fusarium</i> sp., contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	59

CAPITULO III:

Tabela 1	Percentual do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>FA16</i> sp, contendo meio de cultura BDA + extratos de basidiomicetos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	73
Tabela 2	Equações de regressão para percentagem de germinação em função das concentrações. -----	78

Tabela 3	Percentual de germinação dos escleródios, em relação a testemunha, de <i>FA16</i> , contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	80
----------	--	----

APÊNDICE

Tabela 1	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>Fusarium</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>P. sanguineus</i> na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	89
Tabela 2	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>Fusarium</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>L.crinitus</i> na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	90
Tabela 3	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>Fusarium</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	91
Tabela 4	Contagem da média de conídios de <i>Fusarium</i> sp. não germinado em 16h de incubação, em diferentes concentrações de extratos bruto dos fungos. Números em parênteses indicam valores mínimo e máximo.-----	92
Tabela 5	Média de germinação dos escleródios de <i>Fusarium</i> sp., contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	96
Tabela 6	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>FA16</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>P. sanguineus</i> na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	97
Tabela 7	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>FA16</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>L.crinitus</i> na concentração de 1, 10,	

	100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	98
Tabela 8	Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de <i>FA16</i> sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	99
Tabela 9	Contagem da média de conídios de <i>FA16</i> não germinado em 16h de incubação, em diferentes concentrações de extratos bruto dos fungos. Números em parênteses indicam valores mínimo e máximo-----	100
Tabela 10	Média de germinação dos escleródios de <i>FA16</i> . em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. -----	104

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

Figura 1	Carpóforo do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> -----	32
Figura 2	Carpóforo do fungo <i>Lentinus crinitus</i> -----	32
Figura 3	Carpóforo triturado de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> -----	33
Figura 4	Extração a quente-----	33
Figura 5	Extração em aparelho ultrassônico-----	33
Figura 6	Extração a frio-----	33
Figura 7	Amostra vegetal-----	34
Figura 8	Disposição das amostras vegetal em BDA-----	34
Figura 9	Análise microscópica mostrando hifas do FA16-----	34
Figura 10	Análise microscópica <i>Fusarium</i> sp. -----	34
Figura 11	Extratos fúngicos nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -----	35
Figura 12	Micélio do fungo patogênico em meio BDA-----	35
Figura 13	Medição do crescimento micelial (cm) em <i>Fusarium</i> sp-----	35
Figura 14	Medição do crescimento micelial (cm) em FA16 sp. -----	35
Figura 15	Extrato bruto e suas dissoluções em dimetil sulfóxido-----	36
Figura 16	Papel filtro embebido com extrato-----	36
Figura 17	Disposição dos discos de papel celofane na placa de Petri-----	36
Figura 18	Suspensão de conídios acrescentados em discos de papel celofane-----	36
Figura 19	Crescimento do <i>Fusarium</i> sp. Em placa de Petri-----	38

Figura 20	Crescimento do FA16 em placa de Petri-----	38
-----------	--	----

CAPITULO II:

Figura 1	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de <i>P. sanguineus</i> em diferentes solventes de extração.-----	55
Figura 2	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de <i>L. crinitus</i> em diferentes solventes de extração. -----	56
Figura 3	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos do Consórcio de <i>L. crinitus</i> com <i>P. sanguineus</i> em diferentes solventes de extração. -----	57
Figura 4	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinado em extrato H ₂ O-Q e H-Q de <i>P. sanguineus</i> .-----	59
Figura 5	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinados em extrato H ₂ O-Q e H-Q de <i>L. crinitus</i> .-	59
Figura 6	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinados em extrato H ₂ O-Q, H ₂ O-F, H-Q e H-F do consorcio de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> . -----	59

CAPITULO III:

Figura 1	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de <i>P. sanguineus</i> em diferentes solventes de extração. -----	75
Figura 2	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de <i>L. crinitus</i> em diferentes solventes de extração. -----	77

Figura 3	Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) 1µg mL ⁻¹ , (b) 10µg mL ⁻¹ , (c) 100µg mL ⁻¹ e (d) 1000µg mL ⁻¹ , em extratos do consórcio de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> em diferentes solventes de extração. -----	78
Figura 4	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinado em extrato H2O-Q, H2O-US e H-F de <i>P. sanguineus</i> . -----	80
Figura 5	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinado em extrato H2O-Q, H2O-US e H-F de <i>L. crinitus</i> . -----	80
Figura 6	Representação gráfica da equação de regressão, ajustada para os conídios não germinado em extrato H2O-F, H2O-US, H-Q e H-F do consórcio de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> . -----	80

APÊNDICE

Figura 1	Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H2O-US (c) e H-F (d) de <i>P. sanguineus</i> contra <i>Fusarium</i> sp.-----	93
Figura 2	Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-F (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) de <i>L. crinitus</i> contra <i>Fusarium</i> sp-----	94
Figura 3	Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-Q (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) do consórcio de <i>P. sanguineus</i> e <i>L. crinitus</i> contra <i>Fusarium</i> sp-----	95
Figura 4	Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H2O-US (c) e H-Q (d) de <i>P. sanguineus</i> contra <i>FA16</i> sp-----	101

- Figura 5 Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H-Q (c) e H-F (d) de *L. crinitus* contra *FA16* sp----- 102
- Figura 6 Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinado em extratos H2O-Q (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* contra *FA16* sp----- 103

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO -----	18
2. OBJETIVOS -----	21
2.1 OBJETIVO GERAL-----	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	21
3. REVISÃO DE LITERATURA -----	22
3.1 FITOPATÓGENOS-----	23
3.1.1 Controle químico-----	23
3.1.2 Características dos fitopatógenos-----	25
3.2 USO DE BASIDIOCARPOS NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS-----	
3.2.1 <i>Pycnoporus Sanguineus</i> (Fr.) Murr -----	25
3.2.2 <i>Lentinus crinitus</i> (L.:Fr) Fr-----	28
3.3 CONTROLE BIOLÓGICO-----	29
3.3.1 Problemas com o controle biológico-----	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	31
4.1 COLETA-----	32
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>Pycnoporus sanguineus</i> E <i>Lentinus crinitus</i> -----	32
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FITOPATOGENOS-----	32
4.4 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS-----	33
4.5 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS-----	36
4.6 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS--	37
4.7 CONSÓRCIO DE FUNGOS-----	38
4.7.1 Preparo dos extratos-----	38
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	38
REFERENCIAS -----	39

CAPÍTULO II

Atividade “*in vitro*” de extratos de *P. sanguineus* e *L. crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium sp.*

RESUMO-----	48
ABSTRACT-----	48
INTRODUÇÃO-----	49
MATERIAIS E METODOS-----	51
RESULTADOS-----	53
CRESCIMENTO MICELIAL-----	53
GERMINAÇÃO DE CONÍDIO-----	55
GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS-----	60
DISCUSSÃO-----	61
CONCLUSÃO-----	64
REFERENCIAS-----	65

CAPÍTULO III

Potencial de inibição de extratos fungicos frente a germinação de conídios e escleródios do fitopatógeno FA16 *sp.*

RESUMO-----	68
ABSTRACT-----	68
INTRODUÇÃO-----	69
MATERIAIS E MÉTODOS-----	70
RESULTADOS-----	72
CRESCIMENTO MICELIAL-----	72
GERMINAÇÃO DE CONÍDIO-----	75
GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS-----	81
DISCUSSÃO-----	82
CONCLUSÃO-----	84
REFERENCIAS-----	85
SUGESTÕES GERAIS-----	88
APÊNDICE-----	89

Introdução

No município de Parintins, a produção de hortaliças é realizada principalmente na área de várzea. No período das enchentes, existem dificuldades de abastecimento do mercado, mas muitos produtores cultivam hortaliças em canteiros suspensos. Quando as águas sobem, o acesso se dá por canoa. Nas comunidades tradicionais observa-se a prática do “puxirum”, uma espécie de trabalho comunitário realizado em mutirões nas propriedades agrícola geralmente caracterizado pelo costume do corte e queima. As áreas de várzea baixa são utilizadas para o plantio de roças com diversas culturas consorciadas. Por outro lado, nas áreas de várzea alta, próxima às casas, são plantadas muitas frutíferas em quintais caseiros e em áreas menores, ou em canteiros suspensos, são cultivadas hortaliças (XISTO, 2009).

Os agricultores da região periurbana de Parintins plantam principalmente cebolinha (*Allium fistulosum*), coentro (*Coriandrum sativum*) e couve (*Brassica oleracea*), as verduras mais consumidas na região. O tamanho das propriedades varia de 0,07ha a 20ha. Todos os agricultores possuem também árvores frutíferas na sua propriedade e a maioria possui também animais, principalmente aves. A maioria dos agricultores produzem hortaliças em balcões suspensos com tamanho variando de 3m² a 12m². Alguns plantam em casa de vegetação (área média de 80m²) e em leira (FRAGATA DE OLIVEIRA *et al*, 2009). Os pequenos produtores de hortaliças do município de Parintins vem ao longo do tempo perdendo sua produção devido ao ataque de insetos e fungos, o que leva a alguns produtores recorrerem ao uso de inseticidas e fungicidas, prática cada vez mais frequente nessa região.

A sustentabilidade de muitas culturas de importância agrícola vem sendo obtida graças à utilização de produtos químicos conhecidos como “fungicidas”. O

emprego de tais produtos, principalmente quando utilizados de forma inadequada, provoca danos tanto ao homem como ao ambiente (DOMINGUES, 2008).

No passado, as doenças fúngicas foram responsáveis por grandes tragédias as quais resultaram na perda de milhões de vidas humanas, falência de bancos e produtores, mudança de hábitos alimentares, etc. (KIMATI, 1995 e AGRIOS, 1997). Apesar das doenças fúngicas não mais causarem grandes catástrofes humanitárias, elas provocam prejuízos importantes, não só para os produtores, mas também para as comunidades rurais, para os consumidores que são obrigados a gastar mais para obter o mesmo produto, ou até mesmo mudar de produto e para os governos que têm de investir em novas pesquisas e programas de controle, enfim para toda a sociedade (DOMINGUES, 2008).

O emprego de fungicidas em larga escala na agricultura com o objetivo de controlar fitopatógenos, começou com a descoberta de forma acidental da calda bordalesa por Millardet em 1882. A mistura de sulfato de cobre neutralizado com hidróxido de cálcio pulverizada sobre vinhedos, além de evitar a coleta furtiva pelo aspecto azulado conferido à folhagem, mostrou-se efetiva contra o míldio da videira, causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (KIMATI, 1995). A partir de então, diversos grupos de substâncias com ação fungicida foram sendo descobertos, desenvolvidos e utilizados comercialmente pelos agricultores.

A utilização de fungicidas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir alta produtividade e qualidade de produção, visadas pela agricultura moderna (KIMATI, 1995). Ao mesmo tempo, é também considerada uma tecnologia que traz impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública (BETTIOL, 1997).

Apesar de todo investimento feito pelas empresas de agrotóxicos em pesquisas que visem à obtenção de produtos menos tóxicos (AZEVEDO, 2003 e KIMATI 1995), o que se verifica ainda é que 32% dos produtos registrados são pertencentes à classe toxicológica I e II (extremamente tóxicos e altamente tóxicos, respectivamente), enquanto 27 % pertencem à classe IV (pouco tóxicos) (BRASIL, 2010). A utilização inadequada de tais produtos tem trazido como conseqüências: a geração de produtos de degradação ou metabólitos, a persistência de produtos no meio ambiente (meia vida), os resíduos acima dos limites de tolerância em alimentos (ZAMBOLIM *et al.* 2000; AZEVEDO 2003), além da intoxicação dos agricultores, a eliminação dos microrganismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica

e por controle biológico (SCHWAN-ESTRADA *et al.* 2003). O uso indiscriminado de fungicidas pode promover ainda, a seleção de fungos resistentes colocando em risco a eficiência do método (GHINI *et al.*, 2002; AZEVEDO 2003).

Em virtude dos danos causados pelos fungicidas sintéticos, da possibilidade do surgimento de populações de fitopatógenos resistentes a tais produtos e da exigência cada vez maior do mercado por produtos agrícolas livres desses químicos, é de fundamental importância o direcionamento de pesquisas em torno de outros métodos de manejo, para que esses possam ser integrados em um programa de manejo de doenças de plantas em pré e pós-colheita. Nesse contexto, o controle biológico em produtos agrícolas restringe a aplicação abusiva de fungicidas, sendo um importante aliado ao meio ambiente e aos consumidores de tais produtos, uma vez que estes não possuem resíduos de defensivos agrícola (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Segundo Azevedo (2003), plantas e fungos representam uma fonte alternativa quase inesgotável de novas estruturas químicas. A descoberta das estrobilurinas, por exemplo, grupo de fungicidas desenvolvidos a partir de compostos de origem natural (estrobilurina A e oudemansina A), trouxe para a agricultura a opção de um produto com características altamente favoráveis como: perfil agroecotoxicológico favorável, modo de ação distinto dos grupos já existentes e espectro de ação sobre fungos pertencentes às subdivisões Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina (AMMERMANN *et al.* 1992; HEANEY *et al.*, 1994).

Dessa forma o estudo da atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de extratos fúngicos pode contribuir tanto para o desenvolvimento de uma forma potencial de controle alternativo, quando utilizado diretamente, como numa fonte de substâncias que nas mãos de empresas químicas tornam-se produtos a serem utilizados no controle de doenças fúngicas na agricultura (DOMINGUES, 2008).

Assim, o presente trabalho teve por finalidade estudar a potencialidade “*in vitro*” dos extratos de basidiomicetos da flora amazônica no controle dos fungos causadores de graves prejuízos às culturas de hortaliças da região do Baixo Amazonas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos extratos de espécies de basidiomicetos nativos, na inibição “*in vitro*”, de fitopatógenos em hortaliças dos pequenos produtores de Parintins/AM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fitopatógenos causadores de danos às hortaliças no município de Parintins/AM;
- Obter extratos de basidiocarpos de fungos da região do Baixo Amazonas;
- Testar a capacidade dos extratos de inibirem o crescimento micelial, germinação de conídio e escleródios do fitopatógeno;
- Contribuir para coleção do banco de dados de fungos decompositores de madeira, da região Amazônica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O rápido crescimento industrial e urbano das últimas décadas aumentou a complexidade dos resíduos lançados no meio ambiente, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos. A partir do século XX foram sintetizados vários compostos das indústrias química, farmacêutica, de fertilizantes e de pesticidas que, não encontrando decompositores naturais, não participam dos ciclos biogeoquímicos. Esses compostos são estáveis, sob condições aeróbias e anaeróbias, acumulando-se no ambiente. Tais compostos são chamados genericamente de xenobióticos e podem se tornar recalcitrantes e persistentes (SEMPLE *et al.* 2001).

Um grande número de substâncias químicas e sintéticas (haloaromáticos, pesticidas, compostos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas, dioxinas, entre outros) foram introduzidas no mercado sem prévia avaliação do seu impacto ambiental. O resultado foi, em muitos casos, a poluição do meio ambiente por contaminantes tóxicos, colocando em risco a saúde humana e a integridade dos ecossistemas (BOOPATHY 2000, POINTING 2001, RABINOVICH *et al.* 2004).

Os principais exemplos desses compostos poluentes são os defensivos agrícolas, que no início do século passado eram, em sua maioria, de composição inorgânica e muito estáveis no ambiente. A partir da década de 1940 os pesticidas inorgânicos foram substituídos por orgânicos. Isso aconteceu por acreditar-se que o problema da persistência seria resolvido, pela atuação conjunta dos agentes degradativos bióticos e abióticos sobre esses compostos. No entanto, o uso desses pesticidas orgânicos apresentou problemas de toxicidade e persistência no ambiente, resultando em biomagnificação na cadeia alimentar, provocando efeitos tóxicos ligados ao declínio de populações até em níveis tróficos mais altos (SILVA *et al.*, 1997).

No Brasil, o consumo de defensivos agrícolas no ano de 2000 passou de 130.000 toneladas, incluindo herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, moluscidas e reguladores de crescimento. Os estados brasileiros com maior volume de consumo desses defensivos foram: Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás (BRASIL, 2003).

Já no estado do Amazonas a proporção de agricultores dos diferentes municípios do estado que cultivam frutas e legumes com uso de agrotóxico varia

entre 64% e 96,7% (IBGE, 1998). Os agricultores da região não estão preparados para o uso adequado desta “tecnologia”, ignoram o risco do uso de agrotóxicos para saúde e o ambiente e não recebem ajuda técnica de serviços de extensão oficiais (WAICHMAN *et al.*, 2002, 2003, 2007).

Na região amazônica, a produção de hortaliças teve um grande incentivo devido principalmente à decadência da produção de juta e malva por causa da queda dos preços nos mercados nacionais e internacionais e o rápido retorno financeiro desta atividade, que é alto quando comparado com as culturas tradicionais e outras atividades econômicas desenvolvidas pelos ribeirinhos (WAICHMAN, 2007). A produção de hortaliças na várzea apresentou vários problemas para os agricultores (NODA *et al.*, 1997). Como estes cultivos não estão adaptados às condições tropicais, a suscetibilidade ao ataque de pragas (insetos, fungos e outros) e a competição com vegetação nativa vem forçando os agricultores ao uso intensivo de agrotóxicos. Desta forma, um incremento na produtividade agrícola não pode ser alcançado sem o uso crescente de agrotóxicos, principalmente inseticidas, herbicidas e fungicidas, agentes estes que não são utilizados nas práticas agrícolas tradicionais (ECOBICHON, 2001).

Além da exposição ocupacional dos agricultores, suas famílias, e dos consumidores por meio do consumo de frutas e hortaliças com resíduos de agrotóxicos, é possível que esteja acontecendo a contaminação dos peixes através da contaminação da água, o que representa um risco adicional para as populações locais e para os consumidores de outros locais, principalmente se considerarmos que o peixe é a principal fonte de proteínas para a população do Estado do Amazonas (WAICHMAN, 2008).

3.1 FITOPATÓGENOS

3.1.1 CONTROLE QUÍMICO

Na agricultura moderna, as doenças fúngicas de plantas têm sido controladas principalmente através do uso de fungicidas. Entretanto, as pesquisas indicam que

mesmo com o aumento expressivo do uso de agrotóxicos, as perdas atribuídas a doenças e pragas não sofreram uma redução drástica e os ganhos de produtividade não foram significativos (FIORI-TUTIDA, 2003).

As constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos pesquisadores a investigar algumas alternativas visando redução do uso de fungicidas com resultados promissores no controle de fitopatógenos em diversas culturas. O uso de extratos de microrganismos e produtos oriundos do seu metabolismo é uma prática que vem sendo bastante pesquisada em alguns patossistemas (ASSI, 2005)

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividade e qualidade de produção, visadas pela agricultura moderna (KIMATI, 1995). Os defensivos agrícolas fazem parte do conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura, que ocorreu a partir da década de 60. Com o uso generalizado dos defensivos agrícolas nas mais diferentes condições ambientais, muitos problemas começaram a ser percebidos e diagnosticados, tais como a ocorrência de resíduos em alimentos, a contaminação de solos e águas, o efeito em organismos não visados e a intoxicação de trabalhadores rurais. Com a crescente conscientização sobre o risco do uso desses produtos, houve significativos avanços nas legislações de registro e uso desses químicos em muitos países. Com isso, há uma tendência de se substituir os defensivos agrícolas mais problemáticos em termos ambientais e de saúde humana por produtos químicos mais específicos e que sejam mais seguros (CAMPAHNOLA *et al*, 2003).

O controle químico de doenças de plantas é feito através de vários tipos de produtos, comumente denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas. O grupo mais importante de pesticidas utilizados para o controle de doenças de plantas é o dos fungicidas (KIMATI, 1995).

O uso de fungicidas representa um dos principais métodos de controle de doenças de plantas. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz, colocando em risco a eficiência do método (GHINI *et al*, 2002).

3.1.2 CARACTERÍSTICAS DOS FITOPATÓGENOS

Na ausência de hospedeiro suscetível, o fungo fitopatogênico pode persistir por um longo período no solo, através dos escleródios, suas estruturas de resistência (OLIVEIRA, 2005). Essa sobrevivência vai depender de diversos fatores relacionados ao patógeno e ao ambiente, sendo que geralmente, a alta umidade reduz a longevidade dos escleródios de vários meses para algumas semanas (OLIVEIRA, 2007).

As diferentes estruturas do fungo a serem utilizadas no controle de pragas e suas funções no ciclo natural do patógeno são: a) conídios: com função de reprodução e de disseminação; b) blastosporos: com função de disseminação na hemolinfa do hospedeiro; c) micélio: com função de migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo; d) esporos de resistência: com função de permitir a sobrevivência do fungo no solo. No caso dos fungos mitospóricos pertencentes à classe-forma Hifomicetes grande parte pode ser utilizada na forma de conídios, blastosporos e micélio, sendo as duas primeiras formas geralmente preferidas por serem ambas infectivas ao hospedeiro. A escolha da forma a ser utilizada do fungo vai depender da espécie e isolado do patógeno, da dificuldade na sua produção, do ambiente onde será aplicado e do método de aplicação (LEITE *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2006).

3.2 USO DE BASIDIOCARPOS NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Basidiomicetos constituem uma divisão do reino Fungi que engloba os fungos mais evoluídos, apresentando micélio com hifas septadas. Uma das características do grupo é a presença de estruturas especiais de reprodução os basídios – que formam os basidiósporos. Os basídios podem ser formados diretamente sobre o micélio ou na parte inferior do “chapéu” ou píleo do corpo de frutificação, denominado basidiocarpo. Este, na maioria das espécies, forma o cogumelo quando o basidiocarpo apresenta haste ou estipe. Quando o basidiocarpo não apresenta haste e o píleo é de consistência lenhosa, têm-se o que comumente denomina-se de “orelhas-de-pau” (KRUGNER *et al.*, 1995).

As primeiras pesquisas sobre o potencial dos fungos da divisão Basidiomycota como antibióticos foram realizadas por Anchel, Hervey e Wilkins em 1941 (SANDVEN, 2000), quando examinavam extratos do corpo de frutificação e cultura micelial em mais de duas mil espécies de fungos. Eles detectaram e isolaram o composto pleuromutilin, um diterpeno especialmente usado no tratamento de infecções micoplasmáticas em animais (BRIZUELA *et al.*, 1998), servindo para o desenvolvimento do primeiro antibiótico comercial originado de Basidiomicetos. Todavia, mais de 6 mil metabólitos já foram identificados desses fungos imperfeitos, como compostos fenólicos, ácidos fenilglicoxídicos, purinas, quinonas e derivados terpênicos, tornando difícil o isolamento de novos compostos bioativos. Com o desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação e purificação, os Basidiomycotas estão recebendo atenção como fonte para novas classes de antibióticos desde a década passada (SUAY *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

De acordo com Brizuela *et al.* (1998), em geral, os Basidiomicetos possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de moléculas aromáticas, tanto em meio natural como sintético. Uma das vantagens mais significativas dos Basidiomicetos é o amplo espectro de atividades enzimáticas, destacando-se em diversos sistemas biológicos, principalmente pela sua capacidade de produção de inibidores de enzimas. Sabe-se que a ação de muitos agentes farmacológicos é dada por sua capacidade de inibir determinadas enzimas e que numerosas doenças estão associadas a uma excessiva e/ou não regulada atividade enzimática, sendo que as substâncias inibidoras de enzimas podem apontar atividades farmacológicas benéficas. Mesmo que as bactérias e leveduras ofereçam vantagens tecnológicas de cultivo e conhecimento biológico vasto, os Basidiomicetos apresentam potencialidades de biossíntese mais interessantes e numerosas, sendo condizente aprofundar o estudo do cultivo e manejo destes microrganismos com a finalidade de identificar metabólitos novos e úteis ao homem (BENINCA, 2007).

Entre os Basidiomicetos, a família Polyporaceae tem sido a mais estudada, sendo que aproximadamente 75% de suas espécies apresentam grande atividade antimicrobiana. Numerosos componentes desses fungos, como polissacarídeos derivados da parede celular, apresentam atividade antiviral, citotóxica e/ou antineoplásica (BENINCA, 2007), além do potencial de uso na biorremediação de áreas degradadas (BATISTA *et al.*, 2010).

Estes componentes têm atraído atenção nos últimos anos por sua atividade imunomodulatória que resulta em um efeito na prevenção de tumores (WASSER, 2002). Essas substâncias de alto peso molecular, chamados de Modificadores de Resposta Biológica (BRM) ou imunopotenciadores, agem contra a carcinogênese, mostrando efeitos diretos no combate ao câncer, prevenindo metástases. No mercado Japonês, alguns desses polissacarídeos ligados a proteínas isolados de Basidiomicetos, têm encontrado espaço por apresentarem ação fitotóxica, imunomodulatória, analgésica, antidiabética, inseticida, nematicida e cardiovascular. As pesquisas mais avançadas no isolamento de componentes da família Polyporaceae, bem como de outros Basidiomicetos, são realizadas na Alemanha, Japão, Korea e na China, onde o uso de cogumelos medicinais tornou-se tradição (ZJAWIONY, 2004).

Pacumbaba *et al.* (1999) observaram que o fluido de micélios do basidiomiceto *Lentinula edodes* (Shiitake) possui atividade inibitória em *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Piccinin (2000), trabalhando com filtrados de basidiocarpo, píleo, estipe, filtrado autoclavado de basidiocarpo, filtrado de crescimento micelial e filtrado do micélio macerado do cogumelo *L. edodes*, também observou o eliciamento da produção de fitoalexinas do complexo das deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolinas em soja.

Fiori-Tutida (2003) realizou experimentos utilizando extratos aquosos dos cogumelos *L. edodes* e *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol), verificando que os mesmos estimularam a produção de fitoalexinas em sorgo e soja, induziram a produção de proteínas-PR (1,3-glucanase e peroxidase) em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de trigo, indicando assim, que esses cogumelos apresentam potencial como eliciadores de resposta de defesa em plântulas.

Di Piero (2003) em seus experimentos com extratos aquosos de Basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei* constatou que ha indução de resistência em plantas de pepino pelos dois cogumelos testados. Em plantas de tomate, apenas *A. blazei* apresentou potencial para o controle da bacteriose *Xanthomonas vesicatoria*.

3.2.1 *PYCNOPORUS SANGUINEUS* (Fr.) Murr.

Posição taxonômica

Reino.....	Fungi
Divisão (Filo).....	Basidiomycota
Classe.....	Basidiomycetes
Subclasse.....	Holobasidiomycetidade
Ordem.....	Aphylophorales
Família.....	Poliporaceae
Gênero.....	<i>Pycnoporus</i>
Espécie.....	<i>sanguineus</i>

P. sanguineus um fungo do tipo saprófita de crescimento lento, pertencente a Divisão Basidiomycota, da família Poliporaceae, responsável pela decomposição de tecidos xilemático; apresenta uma frutificação semi-circular e pode ser encontrado distribuído horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-laranjada. Esse fungo há muito tempo é usado na África para o tratamento de várias enfermidades. Possui componentes para o tratamento de reumatismos, artrites e gota, possuindo ainda atividade antibacteriana e antifúngica. (BENINCA, 2007).

Zulfadhly *et al.* (2001) indicam o uso de *P. sanguineus* para a remoção de metais pesados, como Pb^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} fixados na coluna do leito de rios. Araújo *et al.* (2010) destaca a influência do processo enzimático utilizando o fungo amazônico *P. sanguineus* na fabricação de papel.

Smânia Jr. *et al.* (2003) realizaram experimentos com toxicidade e atividade antiviral de cinnabarina obtida com extratos etanólico e cetônico de *P. sanguineus* e observaram que essa substância, mesmo em baixas concentrações (0,62 mg mL), causou alterações na viabilidade e morfologia das células de camundongos, porém, sem causar injúria sistêmica ou morte em baixas ou em altas concentrações.

Rosa *et al.* (2003) em um “screening” com Basidiomicetos para testar a atividade antimicrobiana, testaram 84 espécies desta ordem de fungos de diferentes ecossistemas brasileiros contra microrganismos patogênicos e não patogênicos.

Concluíram que o *P. sanguineus* inibiu o crescimento da levedura *Candida krusei* e das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Halaouli *et al.* (2005) identificaram em seus estudos isolado de *P. sanguineus* com potencial para a produção de tirosina, uma substância que demonstrou ser eficiente na síntese de moléculas antioxidantes e no “*crosslinking* de proteínas.

Assi (2005) utilizou extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* em ensaios *in vitro* e no cultivo do feijoeiro, concluindo que houve controle do patógeno, tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases. Soares, *et al* (2010) destaca o potencial na secreção de lignina-peroxidase e manganês-peroxidase.

Smania (2003) isolou a cinabarina, indicando atividade antimicrobiana e antiviral contra o vírus da raiva.

3.2.2 LENTINUS CRINITUS (L.:FR) FR

Posição taxonômica

Reino.....	Fungi
Divisão (Filo).....	Basidiomycota
Classe.....	Basidiomycetes
Subclasse.....	Holobasidiomycetidaea
Ordem.....	Agaricales
Família.....	Tricholomataceae
Gênero.....	<i>Lentinus</i>
Espécie.....	<i>crinitus</i>

Este fungo apresenta píleo ou chapéu com 2-5cm de diâmetro, frutificações castanhas, deprimidos no centro. Superfície com feixes de pelos de 1mm de comprimento (GUERRERO *et al.*, 1999).

Estudos de etnomicologia apontam este cogumelo como comestível por algumas tribos indígenas, somente após cozimento na brasa, pois, segundo relatos indígenas ele provoca vômitos se ingerido cru (FIDALGO *et al.*, 1979).

Para esta espécie é citada na literatura a atividade antimicrobiana, dada por quatro compostos sesquiterpênicos.(ABATE *et al.*, 1994). Além de mostrar características interessantes para sistemas de biorremediação, como remoção e mineralização de poluentes organoclorados (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus *et al.*, 2002). Matheus (2003) em estudo com este fungo, em escala de laboratório, pôde observar que *L. crinitus* mineralizou até 25% de C-hexaclorobenzeno.

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle de pragas na agricultura, normalmente, é feito por meio de agrotóxicos, que também acabam com os organismos benéficos (predadores, abelhas e outros polinizadores), contaminando o solo e a água. Além disso, fazem com que as pragas adquiram resistência, exigindo doses mais altas ou produtos mais tóxicos. Uma opção eficiente é o controle biológico: a redução das populações de determinado inseto-praga por meio da introdução no ambiente de seus inimigos naturais (insetos, pássaros, ácaros, vírus, etc.). O controle biológico de insetos é definido como a ação de inimigos naturais sobre uma população de praga, a fim de mantê-la numa densidade populacional que não cause danos econômicos à cultura. Esta é uma estratégia particularmente interessante para ser incluída nos programas de controle de pragas de qualquer propriedade agrícola. Utilizam-se predadores, parasitóides (pequenas vespínhas) ou patógenos, nativos ou exóticos, multiplicados no laboratório e liberados posteriormente nas propriedades para controlar as pragas-alvo das culturas (PALLINI, 2009).

Algumas vantagens do uso do controle biológico sobre o químico são: a redução de exposição dos produtores e técnicos aos pesticidas; a ausência de resíduos nos alimentos; o baixíssimo risco de poluição ambiental; ausência de período de carência entre a liberação do inimigo natural e a colheita, e apreciação pelo público que demanda produtos livres de agrotóxicos (PALLINI, 2009).

3.3.1 PROBLEMAS COM O CONTROLE BIOLÓGICO

Embora um arranjo de microrganismos tenha sido demonstrado como protetor das plantas cultivadas contra doenças sob condições experimentais, o desenvolvimento comercial de diversos antagonistas tem sido impedido devido a performance inconsistente entre locais da lavoura e períodos de cultivo. A variação na performance de agentes de controle biológico foi atribuída a diversos fatores. Esses fatores incluem a compatibilidade entre a planta hospedeira e o agente de biocontrole devido ao genótipo da planta hospedeira; práticas agrícolas; mutações de organismos de biocontrole resultando na perda da efetividade; resistência do patógeno aos mecanismos de biocontrole; vulnerabilidade do agente de biocontrole para mecanismos de defesa do patógeno e efeitos do ambiente na sobrevivência e efetividade do agente de biocontrole (TRIGIANO *et al.* 2010).

Antagonistas são organismos vivos, que aplicados diretamente na planta hospedeira, no solo da lavoura ou no meio de plantio em uma casa de vegetação, serão somente ativos se o crescimento e a reprodução forem favorecidos pelo ambiente. Uma alteração nas condições ambientais durante a estação de crescimento pode ter efeitos profundos na habilidade do agente de controle biológico em controlar um fitopatógeno, onde as mesmas condições ambientais podem ter pouco efeito na habilidade de um agrotóxico químico em controlar o patógeno (TRIGIANO *et al.* 2010). A preparação e o armazenamento de inóculo antagonista e a aplicação do antagonista freqüentemente tem necessidades precisas. O inóculo de agente biológicos geralmente não pode ser armazenado em temperaturas extremas que poderiam ser satisfatórias para armazenar um fungicida como pó molhável. Adicionalmente, a vida de prateleira do inóculo antagonista não é tão longa como aquela do agrotóxico; conseqüentemente, os agricultores não podem armazenar grandes quantidades de inóculo antagonista para uso posterior (TRIGIANO *et al.* 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA

Carpóforos de fungos de basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* (Figuras 01 e 02), foram coletados com seus substratos em áreas rurais e periurbana do município de Parintins, região do baixo Amazonas. Os fungos coletados foram acondicionados em sacos de papel com as devidas informações sobre local, data, coletor e tipo de substrato. Em seguida levados ao laboratório de Biologia do Centro de Estudos Superiores de Parintins – CESP/UEA para serem inoculados em meio de cultura BDA (*potato starch* 4g, dextrose 20g, agar 15g), para uso das etapas seguintes da pesquisa.



Figura 1: Carpóforo do fungo *Pycnoporus sanguineus*

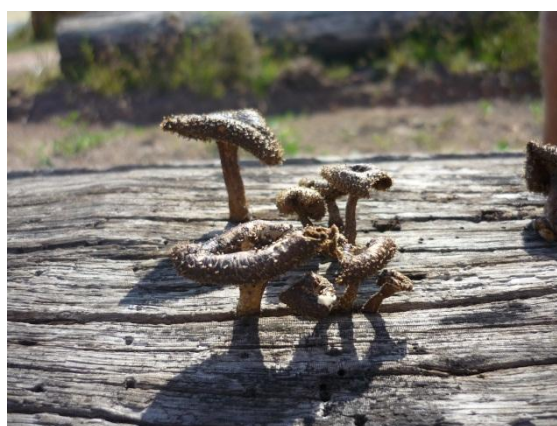


Figura 2: Carpóforo do fungo *Lentinus crinitus*

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Carpóforo dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* foram triturados em moinho de faca, passado em peneira 60 mesh e pesado 50 gramas de cada (Fig. 03), para em seguida serem utilizados na obtenção dos extratos aquoso frio (H₂O-F), quente (H₂O-Q) e ultrassônico (H₂O-US), e extratos hidroalcoólicos a frio (H-F) e quente (H-Q) na proporção de 1:1 (água:etanol). Os métodos utilizados nas extrações foram: 1) a quente, através de extrator Soxhlet, em extração média de 8 horas (Fig. 04); 2)

extração ultrassônica em ultrassom à temperatura de 50 °C por 25min de extração (Fig. 05); e 3) com a solução em repouso por um período de 72h em um recipiente âmbar (Fig. 06).



Figura 3: Carpóforo triturado de *P. sanguineus* e *L. crinitus*



Figura 4: Extração a quente



Figura 5: Extração em aparelho ultrassônico



Figura 6: Extração à frio

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida, observando-se o ponto de ebulição de cada solvente (etanol= 78,5 °C, água= 100 °C).

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FITOPATOGENOS

Foram coletadas em hortas de pequenos produtores do municípios de Parintins, amostra de plantas com sintomas de contaminação por fitopatógeno (Fig.

07). Fragmentos de 8 a 12 cm, nas proximidades do tecido lesionado, das amostras vegetais de hortaliças, foram pesadas, realizada assepsia em álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio por 3 min, e novamente em álcool 70% por 30 seg, e enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada, para em seguida serem inoculadas, por fotoperíodo de 12h, em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Fig.08).

Para a identificação do fitopatógeno, fragmentos das colônias fúngicas foram coradas em lactofenol azul algodão e analisados em microscópio óptico para a observação de estruturas reprodutivas, de resistência ou análise da morfologia das hifas (grampos de conexão, septação) (HANLIN *et al*, 1996) (Figs. 09 e 10).



Figura 7: Amostra vegetal

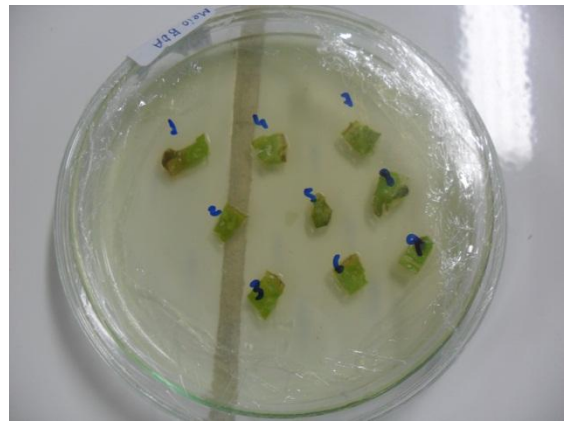


Figura 8: Disposição das amostras vegetal em BDA

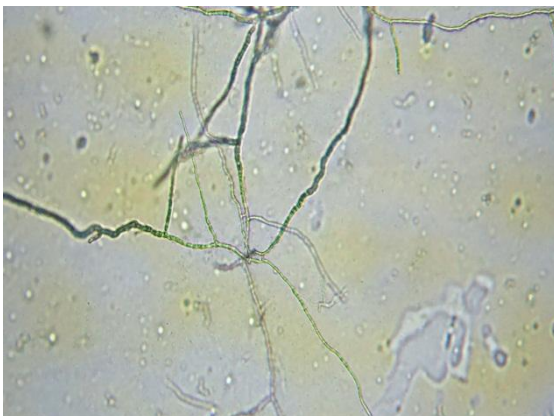


Figura 9: Análise microscópica mostrando hifas do FA16



Figura 10: Análise microscópica *Fusarium* sp.

4.4 TESTE DO EXTRATO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os extratos fúngicos obtidos foram dissolvidos previamente em DMSO (dimetil sulfóxido), e adicionados ao meio BDA nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 11) e vertidos em placas de Petri. Discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos patogênicos, foram transferidos para o centro das placas e mantido em fotoperíodo de 12h (Fig.12). A avaliação do crescimento foi realizada quando as parcelas testemunhas (placa de Petri) foram completamente preenchidas pelos fungos, medindo-se o crescimento radial dos fungos submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa (Figs. 13 e 14).



Figura 11: Extratos fúngicos nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Figura 12: Micélio do fungo patogênico em meio BDA

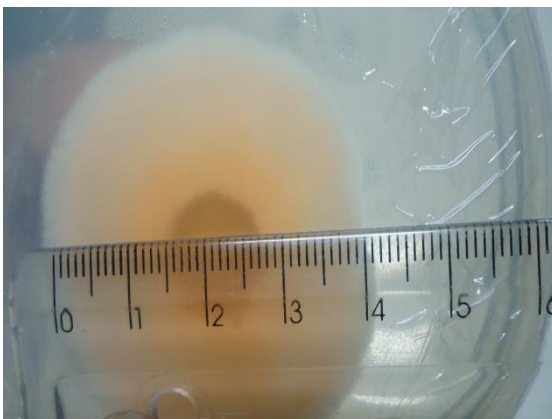


Figura 13: Medição do crescimento micelial (cm) em *Fusarium* sp.

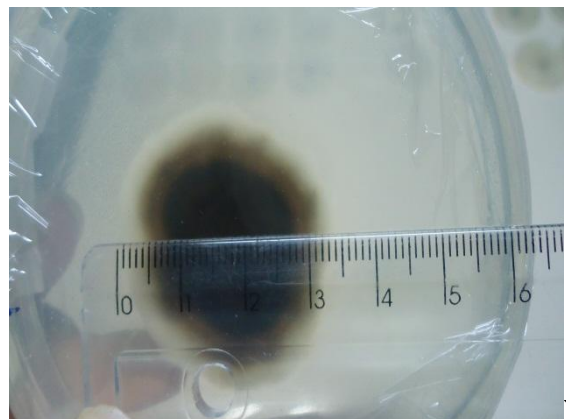


Figura 14: Medição do crescimento micelial (cm) em FA16 sp.

4.5 TESTE DO EXTRATO SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly *et al* (1978). Os extratos fúngicos foram dissolvidos previamente em DMSO (dimetil sulfóxido) (Fig. 15). Dez discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre discos de papel filtro (Fig.17) embebidos com 5 mL da solução de cada extrato nas concentrações 0 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata (Fig.16). Posteriormente, uma gota de suspensão de conídios do fitopatógeno, na concentração de 10^4 conídios. mL^{-1} foi depositada sobre cada disco de celofane (Fig. 18). As placas assim preparadas foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C.



Figura 15: Extrato bruto e suas dissoluções em dimetil sulfóxido



Figura 16: Papel filtro embebido com extrato

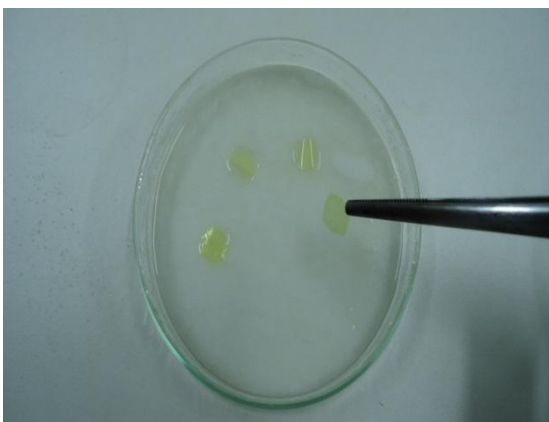


Figura 17: Disposição dos discos de papel celofane na placa de Petri



Figura 18: Suspensão de conídios acrescentados em discos de papel celofane

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 16h de incubação e considerando-se como germinados, aqueles que apresentassem qualquer indício de formação do tubo germinativo. A avaliação foi feita somando-se os conídios germinados com os conídios não germinados (Nesp), obtendo-se assim um total de conídios (TC) por placa de Petri, calculando-se assim a percentagem de não germinação ($Nesp \cdot 100/TC$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri com 10 discos de celofane.

4.6 TESTE DOS EXTRATOS SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS

Escleródios foram inoculados em placas de Petri (5 cm Ø) contendo meio de cultura BDA (Figs. 19 e 20) e cada um dos extratos, nas mesmas concentrações, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial descrito anteriormente, e incubadas por 72h a 25°C e fotoperíodo de 12h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada parcela sendo composta por 6 placas por extrato. A avaliação foi feita contando-se os escleródios germinados e medindo-se o crescimento radial dos fungos submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa calculando-se. Em todos os experimentos realizados, tratamentos contendo dimetil sulfóxido e água destilada autoclavada foram utilizados como controle negativo.



Figura 19: Crescimento do *Fusarium* sp. em placa de Petri



Figura 20: Crescimento do FA16 em placa de Petri

4.7 CONSÓRCIO DE FUNGOS

4.7.1 PREPARO DOS EXTRATOS

Foram utilizados 50 gramas do carpóforo triturado de *P. sanguineus* e misturado com 50 gramas do carpóforo triturado de *L. crinitus* (1:1) em 250 ml de solução hidroalcolica (1:1, água:etanol) para os três métodos de extração: à quente, a frio e ultrassom. A extração foi conforme descrito anteriormente.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o BioEstat 5.0, onde se obteve os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, teste ANOVA para verificar diferenças entre os tratamentos e de Tukey ($p < 0,05$) para contrastes das médias.

REFERENCIAS

ABATE, D; ABRAHAM W.R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, Japan, v. 47, p. 1348-1350, 1994.

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 4.ed. Academic Press, San Diego, 1997, 635p.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da canade-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico do Instituto Biológico*, São Paulo, 19pp., 2006.

AMMERMANN, E., LORENZ, G. e SCHELBERGER, K. *Basf 490f a broad spectrum fungicides with a new mode of action*. Proceedeing of the British Crop Protection Conference, 1992. 2: 589-598.

ARAÚJO, S. P.; SOARES, E. P.; BRAGA, C. M. S.; CASTRO E SILVA, A. *Influência do processo enzimático utilizando o fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus* na fabricação de papel*. In: Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC. Natal-RN, 2010.

ASSI, L. *Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.)*. Marechal Cândido Rondon, 2005. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná NIOESTE. Setembro/2005.

ASSI, L. *Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.)*. Marechal Cândido Rondon, 2005. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná NIOESTE. Setembro/2005.

AZEVEDO, C. P.; FILHO, A. C. C.; HERNZ, G. P.; REIS, A. *Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas*. *Embrapa Hortaliças*, Brasília, 2006.

AZEVEDO, L.A. S. *Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional*. Emopi Editora e Gráfica. Campinas, 2003, 319p.

BATISTA, V. T., SOARES, P.R., CARMO, C. C., DAMASCENO, A. A., CASTRO E SILVA, A. MOURA, S.M. Seleção de fungos basidiomycetos para produção de enzima fenoxidase com vistas ao uso em biorremediação de áreas degradadas. In: Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC. Natal-RN, 2010.

BENINCA, C. P. *Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de Pycnoporus sanguineus*. Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2007.

BETTIOL, W. *Alguns produtos alternativos para o controle de doenças de plantas em agricultura orgânica*. In: Anais do 2o Ciclo de Palestras sobre Agricultura Orgânica, São Paulo. 1997, pp.52-63.

BOOPATHY, R.. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67, 2000.

BRASIL, Comissão Nacional de Segurança Química – CONASQ. Perfil Nacional da gestão de substâncias químicas. *Ministério do Meio Ambiente*, Brasília. 382p., 2003.

BRASIL, 2010. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Agrofit – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários*. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acessado em: 22.10.2010.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍAN, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolites secundários, *Revista Iberoamericana de Micologia*, Revisão, v.15, p.69-74, 1998

CAMPANHOLA, C. Métodos alternativos de controle fitossanitário. *Embrapa Meio Ambiente*, Jaguariúna, 2003. 279p.

DI PIERO, R.M. *Potencial dos cogumelos Lentinula edodes (Shiitake) e Agaricus blazei (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos*. Piracicaba – SP, 2003. 157 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.

DOMINGUES, Ricardo José. *Potencial fungicida “in vitro” de extratos de plantas e de basidiomicetos sobre Alternaria solani (Ell. & Martin) Jones & Grout, Colletotrichum acutatum Simmonds e Sclerotium rolfsii Sacc.* São Paulo, 2008. 70 p.il.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, 160: 27-33, 2001.

FIDALGO, O. & HIRATA, J.M. Etnomicologia caiabi, txicão e txucurramãe. *Rickia*,v.8, p. 1-5, 1979.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. *Uso de extratos dos Cogumelos Lentinula edodes (Berk.) Pegler e Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinem no controle in vitro de Puccinia recondita f. sp tritici e na indução de resistência em trigo à Bipolaris sorokiniana*. Maringá, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, 2003.

FRAGATA DE OLIVEIRA, C. e UGUEN, Katell. Caracterização da Produção de Hortaliças na Região Periurbana de Parintins – AM. *Rev. Bras. De Agroecologia/nov.* 2009 Vol. 4 No. 2

GHINI, R e KIMATI, H. *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna. 2002.

GUERRERO, R.T. e HOMRICH, M.H. *Fungos macroscópicos comuns do Rio Grande do Sul: Guia para identificação*. 2nd ed, UFRGS, Porto Alegre, 42 pp. 1999.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.I.; KRUUS, K.;GUO, L;HAMDI, M.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; LOMASCOLO, A. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 332-343(12), February 2005.

HANLIN, R.T. e MENEZES, M. *Gêneros Ilustrados de actinomicetos*. Universidade Rural de Pernambuco, Recife. 1996, 274p.

HEANEY, S. P. e KNIGHT, S. C. *ICIA5504 a novel broad spectrum systemic fungicide for use on fruit, nut and horticultural crops*. Brighton Crop Protection Conference. 1994 2: 509-16.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 1998. *Censo Agropecuário 1995-1996*.

KIMATI, H. *Controle químico*. In: A. Bergamin Filho, H. Kimati, L. Amorin, (eds.) *Manual de Fitopatologia, 1: Princípios e Conceitos*. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1995, pp. 761-785.

KRUGNER, T.L.; BACHI, L.M.A. Fungos em BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia – Princípios e conceitos*. Vol. 1, 1995.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 92p.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. e MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16 (5): 415-421.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. e MACHADO, K. M. G. New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil. In: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). *Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. San Diego, Battelle Press, 2001, 3v, pp. 99-106.

MATHEUS, D. R. e MACHADO, K. M. G. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. In: Fericola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). *Produtos orgânicos Persistentes – POPs*, CRA, Salvador, 2002, 13: 479-500.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. e MACHADO, K. M. G. & Silva, R. R. & Rodrigues, T. A. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. In: Magar, V. S. & Kelley, M. E. (eds.). In Situ and On-Site Bioremediation. Proceedings of the Seventh. International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Orlando, Battelle Press, Paper G5. 2003.

NELLY, D. *Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematocides and bactericides*. 140 p. Minnessota: American Phytopathological Society. 1978.

NODA, S.N.; PEREIRA, H.S.; BRANCO, F.M.C.; NODA, H. *O trabalho nos sistemas de produção de agriculturas familiares na várzea no estado do Amazonas*. In: Noda, H; Souza, L.A.H.; Fonseca, O.J.M. (Eds.), *Duas décadas de contribuição do INPA à pesquisa agrônômica no trópico úmido*, 1997.

OLIVEIRA, G. G. de. *Trichoderma spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de Sclerotinia sclerotiorum e de patógenos em sementes de cártamo (Carthamus tinctorius)*. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS. 2007.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. *Revista DBO Agrotecnologia*, São Paulo, ano 2, n. 4, Maio/Junho 2005.

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*, v. 83, p.20-23, 1999.

PALLINI, A.. *Controle biológico de pragas e seu uso em cultivos protegidos*. Postado em 13/08/2009. Disponível no site: <<https://www2.cead.ufv.br/espacopr odutor/scripts/verArtigo.php?codigo=21&acao=exibir>> Acesso em 07/02/2012

PICCININ, E. *Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (Lentinula edodes) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo*,

maracujá e fumo. Piracicaba, 2000. 160 p. Tese (doutorado) -Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, 2000.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 20–33, 2001.

RABINOVICH, M. L., BOLOBOVA, A. V. & VASILCHENCO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40 (1): 1-17, 2004.

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, Vol. 98(7), p. 967-974, October, 2003.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Fórum Micológico, v.17, p.73-81, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R. e CRUZ, M. E. S. *Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas*. In: Anais do 36^o Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fitopatologia Brasileira 2003 - 28: 54-56.

SEMPLE, K. T., REID, B. J. & FERMOR, T. R.. REVIEW: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112: 269-283, 2001.

SILVA, C. M. M. S. & FAY, E. F.. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. In: Fernicola, N. A. G e Oliveira, S. S. (Orgs.). *Produtos orgânicos Persistentes – POPs*, CRA, Salvador 3: 67-105, 1997.

SMÂNIA JR, A.; MARQUES, C.J.S.; SMÂNIA, E.F.A.; ZANETTI, C.R.; CAROBREZ, S.G.; TRAMONTE, R.; LEITE, C.L. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, n.17, p.1069-1072. 2003.

SOARES, E. P.; ARAÚJO, S. P., MACIEL, M. J. M.; NUNES, A. S.; CAMARÃO, H. e CASTRO E SILVA, A. Secreção de lignina-peroxidase (lip) e manganês-peroxidase (MnP) do fungo *Pycnoporus sanguineus* em fermentação estacionária. In: Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC. Natal-RN, 2010.

SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F.J.; BASILIO, A.; CABELLO, M.A.; DÍEZ, M.T.; GARCÍA, J.B.; VAL, A.G.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M.F. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities, *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 78, p.129 - 139, 2000.

TRIGIANO, R. N; WINDHAM, M. T e WINDHAM, A. S. Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

WAICHMAN, A. V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*. vol. 38(1) 2008: 45 – 50

WAICHMAN, A. V.; RÖMBKE, J.; NINA, N.C.S. Agrotóxicos: elemento novo na Amazônia. *Ciência Hoje*, 32(190): 70-73, 2003.

WAICHMAN, A.V.; EVE, E.; NINA, N.C.S. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26(4): 576-583, 2007.

WAICHMAN, A.V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M.O.A.; NINA, N.C.S. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 9(6):423-428, 2002.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.60, n.3, p.258-274, 2002.

XISTO, Glauber Jacaúna. Potencialidades dos Recursos Naturais da Várzea para Adubação Orgânica na Agricultura em Comunidades Tradicionais na Região do Paraná de Parintins – AM. *Rev. Bras. de Agroecologia/nov.* 2009 Vol. 4 No. 2

ZAMBOLIM, L., COSTA, H. e VALE, F. X. R. Situação atual do controle químico de doenças de hortaliças. *Horticultura Brasileira* 18 (supl.)- 2000, pp.96-110.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. *Journal of Natural Products*, v.67, n.2, p.300-310, 2004.

ZULFADHLY, Z.; MASHITAH, M.D.; BHATIA, S. Heavy metals removal in fixed-bed column by the macro fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Environmental Pollution*, v.112, p.463-470, 2001.

CAPÍTULO II

**Atividade “*in vitro*” de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus*
sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp.**

Atividade “*in vitro*” de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp.

FIGUEIREDO, Ádrya¹; CASTRO E SILVA, A¹

¹Universidade do Estado do Amazonas-UEA

RESUMO – O controle alternativo de doenças de plantas tem como objetivo minimizar o impacto ambiental através da utilização de produtos naturais. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de extrato aquoso e hidroalcoólico de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* contra *Fusarium* sp., conhecido por causar doenças das culturas. Os fungos foram coletados em áreas periurbanas e rurais de Parintins-AM, e testados em diferentes concentrações de extratos, para avaliar: a) inibição de crescimento micelial, b) inibição da germinação de conídios e c) inibição da germinação de esclerócios. Para avaliação do crescimento micelial e esporulação de escleródios, os isolados foram semeados em meio em meio BDA (batata-dextrose-ágar), com fotoperíodo de 12 horas. A contagem de esporos foi realizada utilizando um microscópio óptico, após 16 horas de incubação. Os melhores resultados de inibição do crescimento micelial foram obtidos com o extrato hidroalcoólico frio. Extrato de *P. sanguineus* em solvente hidroalcoólico frio e extrato aquoso ultra-sônico e *L. crinitus* de solvente hidroalcoólico frio, inibiu mais de 92% da esporulação de conídios. Extratos aquosos quentes para ambos os fungos inibiram a germinação de escleródios, bem como extrato de *P. sanguineus* hidroalcoólico frio. O consórcio dos fungos inibiram a germinação de escleródios em 1000 µg mL⁻¹.

Palavras-chave: fungicida, controle alternativo, basidiomicetos

ABSTRACT – Alternate control of plant diseases aim minimize environmental impacts through the use of natural products. Thus this work had as objective to evaluate *in vitro* activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus crinitus* against *Fusarium* sp. known to cause crops diseases. Fungi were collected in the suburban and rural areas of Parintins-AM, and tested to different extracts concentrations, to assess: a) inhibition of mycelial growth, b) inhibition of conidial germination and c) inhibition of germination of sclerotia. For mycelial growth and sporulation of sclerotia evaluation, the isolates were plated at PDA (potato dextrose agar) medium, with 12 h photoperiod. The spore counting using an optical microscope after 16 hours of incubation was performed.. Mycelial growth inhibition best results was obtained with hydroalcoholic cold extract. *P. sanguineus* hydroalcoholic and aqueous solvent ultrasonic cold extract and *L. crinitus* hydroalcoholic solvent cold extract, inhibited more than 92% of conidia sporulation. Aqueous hot extracts for both fungi inhibited sclerotia germination as well as *L. crinitus* hydroalcoholic cold extract. Fungi consortium inhibited sclerotia germination at 1000 µg mL⁻¹ concentration.

Keywords: fungicides, alternative control, basidiomycetes

INTRODUÇÃO

As doenças de plantas têm sido observadas e registradas por humanos há mais de 2.000 anos (AGRIOS, 2005). Diversas doenças foram inicialmente descritas com base em observações de sinais visíveis (estruturas reprodutivas e vegetativas do patógeno) e sintomas (reações da planta à infecção) nas frutas, folhas, raízes e haste. Desde então, continua-se a investigar o papel que os microrganismos possuem nas doenças de plantas e como sua biologia, ecologia e genética influenciam a patogênese (p. ex; habilidade de um organismo em causar doença). A maioria dos estudos científicos focou principalmente nas espécies de plantas de importância econômica para a agricultura e fomentou o desenvolvimento de métodos experimentais para examinar os patógenos de plantas e suas doenças associadas. Em geral, a maioria dos cultivos agrícolas está sujeita a diversas doenças causadas por um conjunto amplo de fitopatógenos. (TRIGIANO *et al*, 2010)

Um dos fitopatógenos amplamente distribuído ao redor do mundo, encontrado em todos os tipos de solo ou associados a inúmeras espécies vegetais, é o fungo *Fusarium spp*. Este fungo pode sobreviver por longos períodos de forma saprofítica sobre a matéria orgânica do solo e quando possível pode causar inúmeras doenças em diferentes espécies vegetais, sobretudo em culturas de importância econômica, causando grandes prejuízos (MARTINS, 2005).

Embora o maior interesse neste fungo se deve ao fato de causar doenças em um grande número de espécies vegetais, dentro do gênero *Fusarium* têm sido descritos alguns não patogênicos. Entretanto, poucos estudos foram realizados com a finalidade de comparar a variabilidade genética neste grupo, embora estejam presentes em inúmeros locais e representem um dos maiores componentes da comunidade do solo. Além disso, isolados não patogênicos podem ser encontrados, endofiticamente, colonizando o interior da planta hospedeira (DESJARDINS *et al.*, 2000; LESLIE *et al.*, 2001; ZEMANKOVA *et al.*, 2001; GODOY *et al.*, 2004). Estes isolados endofíticos podem apresentar interação simbiótica com o hospedeiro, sendo importantes, não só para o controle biológico de doenças, mas também desempenhando funções que poderão ser benéficas para a planta hospedeira (GODOY *et al.*, 2004).

Sabe-se ainda que isolados patogênicos de *Fusarium spp*. mostram um alto nível de especificidade ao seu hospedeiro, mas a relação destes isolados com

isolados não patogênicos ainda não foi avaliada, o gênero *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso (MARTINS, 2005). A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que alguns isolados são parasitas das plantas. A patogenicidade ao homem é rara, mas muitas espécies causam o apodrecimento de estoques e são importantes produtoras de toxinas (DESJARDINS *et al.*, 2000; LESLIE *et al.*, 2001; ZEMANKOVA *et al.*, 2001; GODOY *et al.*, 2004).

As características e patogenicidade do gênero *Fusarium* o torna de difícil controle para o produtor agrícola, fazendo com que a utilização de produtos químicos seja cada vez mais abusiva. E em virtude dos danos causados pelos fungicidas sintéticos, tanto ao homem quanto ao ambiente, da possibilidade do surgimento de populações de fitopatógenos resistentes a tais produtos e da exigência cada vez maior do mercado por produtos agrícolas livres desses químicos, é de fundamental importância o direcionamento de pesquisas em torno de outros métodos de programa de manejo de doenças de plantas em pré e pós-colheita. Nesse contexto, o controle biológico em produtos agrícolas restringe a aplicação abusiva de fungicidas, sendo um importante aliado ao meio ambiente e aos consumidores de tais produtos, uma vez que estes não possuem resíduos de defensivos agrícolas (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Dentre os agentes fúngicos que podem atuar como biocontroladores de doenças de plantas, destaca-se àqueles da classe dos Basidiomicetos, que incluem aproximadamente 1.200 espécies identificadas (VANDERLINDE, 2010).

As propriedades terapêuticas dos Basidiomycetes vêm sendo reconhecidas por milênios pelos povos orientais, sendo que os primeiros livros chineses sobre produtos naturais, medicinais, datam 200 anos atrás (VANDERLINDE, 2010). Por isso, muitos estudos científicos foram conduzidos com basidiomas destes fungos, com a finalidade de isolar e identificar quimicamente as diversas substâncias ativas, e também determinar suas potencialidades terapêuticas (LOMASCOLO *et al.*, 2003).

Assim, o presente trabalho teve por finalidade avaliar a potencialidade *in vitro* dos extratos de basidiomicetos de *P. sanguineus* e *L. crinitus* em inibir o fitopatógeno *Fusarium sp.*, isolado de culturas de alface do município de Parintins-AM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Carpóforos de fungos de basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* e *L. crinitus*, foram coletados com seus substratos em áreas rurais e periurbana do município de Parintins, região do baixo Amazonas. Em seguida, no laboratório de Biologia do Centro de Estudo Superiores de Parintins-CESPE/UEA, foram triturados em moinho de faca, passado em peneira 60 mesh e pesado 50 gramas de cada, para serem utilizados na obtenção dos extratos aquoso frio (H₂O-F), quente (H₂O-Q) e ultrassônico (H₂O-US), e extratos hidroalcólicos a frio (H-F) e quente (H-Q) na proporção de 1:1 (água:etanol). Os métodos utilizados nas extrações foram: 1) a quente, através de extrator Soxhlet, em extração média de 8 horas; 2) extração ultrassônica em ultrassom à temperatura de 50 °C por 25min de extração; e 3) com a solução em repouso por um período de 72h em um recipiente âmbar. Também foi realizado o consórcio dos fungos, onde foram utilizados 25 gramas do carpóforo triturado de *P. sanguineus* e misturado com 25 gramas do carpóforo triturado de *L. crinitus* (1:1) em 250 ml de solução hidroalcolica (1:1, água:etanol) para os três métodos de extração: à quente, a frio e ultrassom.

Para o isolamento do fitopatógeno, *Fusarium* sp, fragmentos de 8 a 12 cm, de amostras vegetais de hortaliças doentes, foram pesadas e após realizar assepsia foram inoculadas, em fotoperíodo de 12h, em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após o crescimento para a identificação do fitopatógeno, fragmentos das colônias fúngicas foram coradas em lactofenol azul algodão e analisados em microscópio óptico para a observação de estruturas reprodutivas, de resistência ou análise da morfologia das hifas (grampos de conexão, septação e etc.) (Hanlin *et al*, 1996).

Os extratos fúngicos obtidos foram dissolvidos previamente em DMSO (dimetil sulfóxido), e adicionados ao meio BDA nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg mL⁻¹, vertidos em placas de Petri, para realização dos testes: a) crescimento micelial; b) germinação de conídios e c) germinação de escleródios.

No teste do crescimento micelial discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos, foram transferidos para o centro das 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 submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa.

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly *et al* (1978). Dez discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre discos de papel filtro embebidos com 5 mL da solução de cada extrato nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata. Posteriormente, uma gota de suspensão de conídios do fitopatígeno, na concentração de 10^4 conídios. mL^{-1} foi depositada sobre cada disco de celofane. As placas assim preparadas foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C.

A observação foi feita em microscópio óptico após 16h de incubação, considerando-se como germinados, aqueles que apresentassem qualquer indício de formação do tubo germinativo. A avaliação foi feita somando-se os conídios germinados com os conídios não germinados (Nesp), obtendo-se assim um total de conídios (TC) por placa de Petri, calculando-se assim a percentagem de não germinação ($\text{Nesp} \times 100 / \text{TC}$).

Já na avaliação da germinação de escleródios, foram inoculados 10 escleródios em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e cada um dos extratos, nas mesmas concentrações, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial descrito anteriormente. Em seguida incubadas por 72h a 25°C em fotoperíodo de 12h. A avaliação foi feita medindo-se o crescimento radial dos fungos submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa. Em todos os experimentos realizados, tratamentos contendo dimetil sulfóxido e água destilada autoclavada foram utilizados como controle negativo.

Enfim, para a análise estatística dos dados utilizou-se o BioEstat 5.0, onde se obteve os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, teste ANOVA para verificar diferenças entre os tratamentos e de Tukey ($p < 0,05$) para contrastes das médias.

RESULTADOS

CRESCIMENTO MICELIAL

Nas condições em que os experimentos foram realizados, no geral os melhores resultados, com o menor crescimento micelial, em comparação ao tratamento com a testemunha, foram obtidos com os extratos H-F (Tabela 1).

No extrato H₂O-Q de *P. sanguineus*, foi onde ocorreu o menor crescimento micelial do *Fusarium* sp, crescimento 60% menor, nas concentrações 1, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 40% na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em comparação com a testemunha. Já o extrato do basidiocarpo de *L. crinitus* obteve o melhor resultado em 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com 50% a menos do crescimento. O extrato do consórcio dos fungos não revelou dados significativos em comparação aos experimentos testemunha.

O extrato H₂O-F de *P. sanguineus* proporcionou os menores valores de crescimento em relação ao *L. crinitus* e consórcio desses fungos, com crescimento micelial 70% menor nas concentrações 10 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em relação a testemunha. Nos tratamentos com extrato de *L. crinitus* e consórcio, não houve inibição na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e nas demais concentrações variaram de 10 a 40%.

Na maioria dos tratamentos realizados em extratos H-Q, não houve inibição no crescimento micelial, em relação a testemunha. No extrato *L. crinitus*, o crescimento do *Fusarium* sp. em todas as concentrações, foi maior quando comparado com a testemunha. Já para o extrato de *P. sanguineus* nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o crescimento foi 80% maior do que da testemunha. Por outro lado, o extrato do consórcio desses fungos mostrou resultados equiparados com àqueles das testemunhas.

O extrato H-F dos fungos estudados, inibiu o crescimento do *Fusarium* sp em até 70% na maior concentração, 50% e 60% nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já o extrato em consórcio não tiveram bons resultados, variando de 10 a 50% de inibição.

O extrato aquoso ultrassônico dos fungos, inibiu o crescimento em 70% na maior concentração testada em relação à testemunha, e de 40 e 60%, nas concentrações 10 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual do crescimento micelial (cm) de *Fusarium* sp., contendo meio de cultura BDA + extratos de basidiomicetos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Extrato	Fungo	Tratamentos			
		1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
H2O-Q	<i>P. sanguineus</i>	40	60	40	40
	<i>L. crinitus</i>	80	50	60	60
	Consórcio	100	100	90	80
H2O-F	<i>P. sanguineus</i>	40	30	60	30
	<i>L. crinitus</i>	90	60	70	60
	Consórcio	90	80	80	80
H2O-US	<i>P. sanguineus</i>	70 ^a	50 ^a	50 ^a	30 ^a
	<i>L. crinitus</i>	70 ^a	60 ^a	40 ^a	30 ^a
	Consórcio	80 ^b	50 ^a	40 ^a	30 ^c
H-Q	<i>P. sanguineus</i>	130 ^a	180 ^b	70 ^c	80 ^a
	<i>L. crinitus</i>	130 ^a	170 ^a	170 ^a	140 ^a
	Consórcio	110 ^a	80 ^a	80 ^a	90 ^a
H-F	<i>P. sanguineus</i>	50	50	40	30
	<i>L. crinitus</i>	70	50	40	30
	Consórcio	100	50	70	80
	Testemunha	100	100	100	100

Letras iguais na horizontal significa que não há diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade.

GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Os resultados da germinação de conídios do fitopatógeno *Fusarium* sp. com todos os extratos estão apresentados nas Figuras 01, 02 e 03. No geral, os melhores resultados, com mais de 92% dos conídios não germinados, foram obtidos com os extratos de *P. sanguineus* em solvente H₂O-US e H-F, assim como os extratos de *L. crinitus* revelou seu melhor resultado em solvente H-F. Já para o extrato do Consórcio dos fungos o H₂O-US, foi onde ocorreu o maior percentual de conídios não germinados.

A análise de dados dos extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações e solventes testados mostrou que o extrato H₂O-US nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e extrato H-F na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tiveram os melhores resultados, inibindo a germinação dos conídios em mais de 92%. Já na concentração de 1 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou inibição de 34,1% e 79,8% nos solventes de extração H₂O-US e H-F, respectivamente (Figura 1).

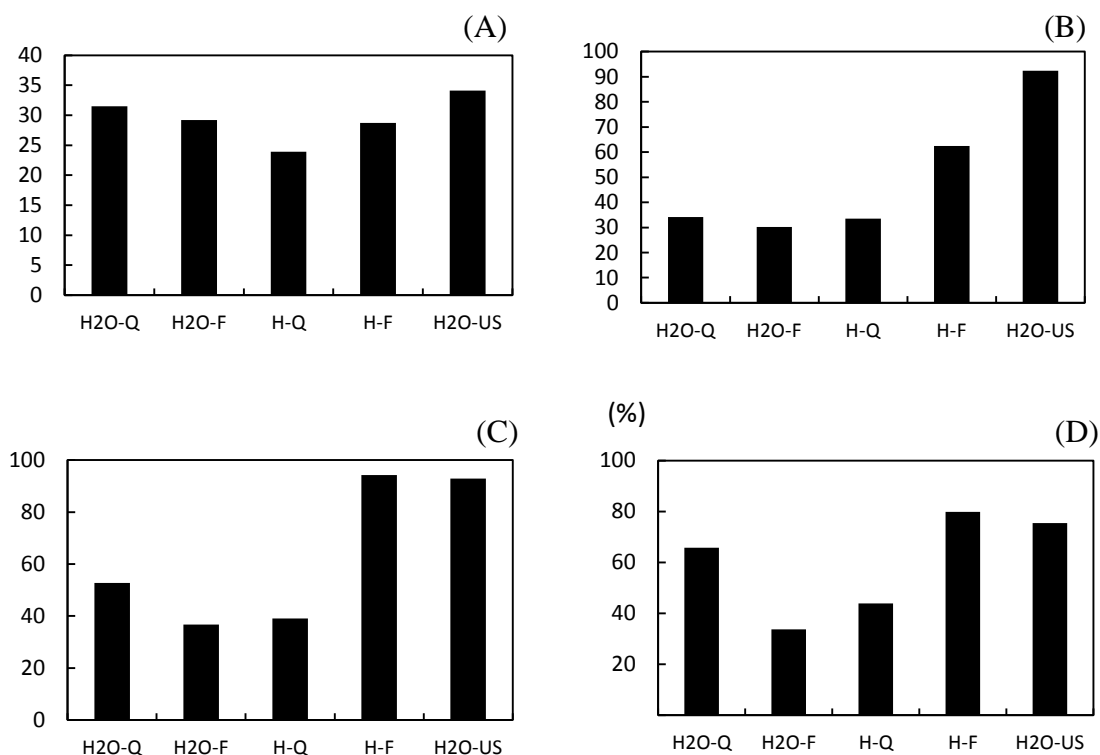


Figura 1 Percentual de conídios não germinados na concentração de (a) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de *P. sanguineus* em diferentes solventes de extração. (

A inibição da germinação dos conídios frente aos extratos de *L. crinitus* mostrou que o solvente H-F na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu 95,4%, sendo este o melhor resultado, pois nessa mesma concentração nos diferentes solventes de extração variou entre 26 a 33%. Em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ os melhores resultados foram nos extratos aquosos (quente e frio) e hidroalcolico quente com 30 e 31%. Enquanto que em 100 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ os extratos aquoso a quente e hidroalcolico a quente mostraram 49 e 65% , respectivamente (Figura 2).

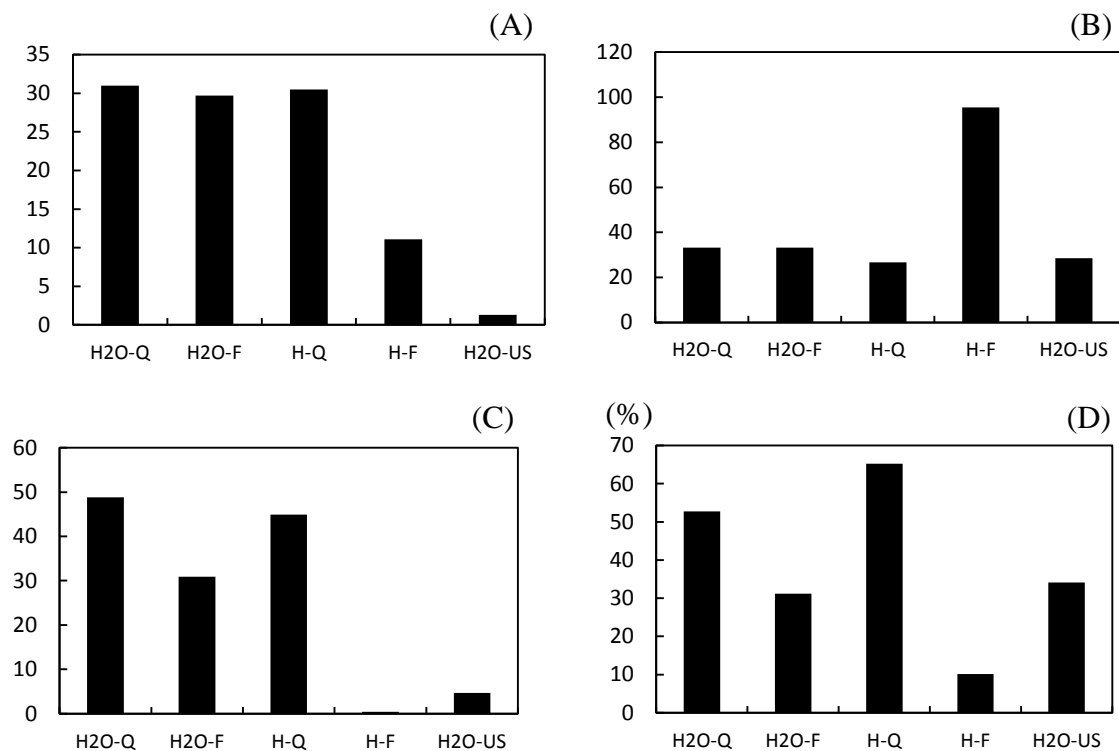


Figura 2 Percentual de conídios não germinado na concentração de (a) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de *L. crinitus* em diferentes solventes de extração.

A inibição da germinação de conídios acima de 90%, indica que os extratos do carpóforo dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* tem potencial inibição de conídios do *Fusarium* sp., fato que pode estar associado a liberação de compostos antimicrobiano por estes basidiomicetos. O consórcio dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* nos diferentes solventes de extração mostrou que o extrato H2O-US foi o que apresentou inibição na germinação de conídios de 97%, 89% e 94% nas

concentrações 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Enquanto o melhor resultado na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi o extrato H₂O-F com 47% de inibição (Figura 3).

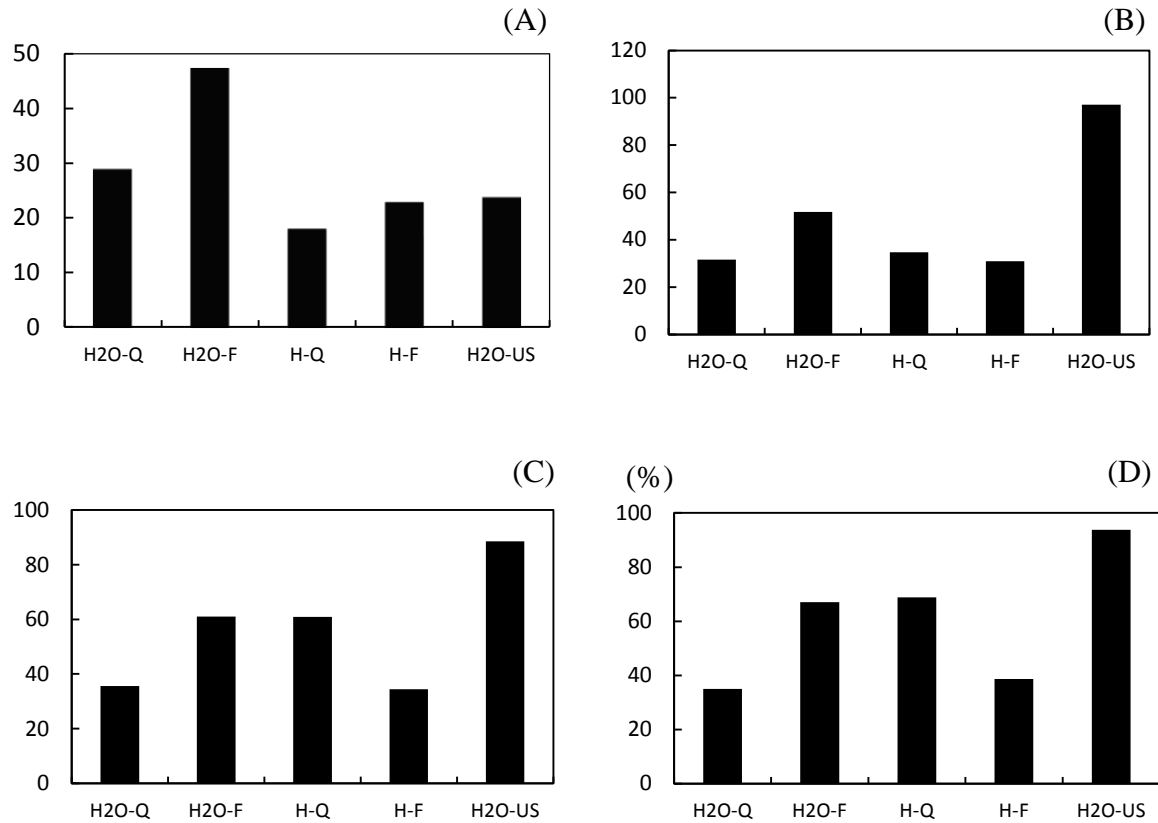


Figura 3 Percentual de conídios não germinados na concentração de (a) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos do Consórcio de *L. crinitus* com *P. sanguineus* em diferentes solventes de extração. (Legenda: H₂O-Q extrato aquoso quente; H₂F-Q extrato aquoso frio; H-Q extrato hidroalcolico quente; H-F extrato hidroalcolico frio e H₂O-US extrato aquoso ultrassônico)

Na tentativa de verificar o grau de relação entre as variáveis de concentração e a percentagem de conídios não germinados quatro modelos estatísticos (linear, geométrica, exponencial e logarítmico) foram testados.

Os maiores índices de determinação (R^2), que determinam o grau de correlação entre as variáveis, foram obtidos para o consórcio de fungos, embora para o H₂O-US este tenha sido fraco.

L. crinitus apresenta uma relação fraca para os extratos H₂O-F, H₂O-US e H-F, enquanto que *P. sanguineus* para os extratos H₂O-F e H₂O-US (Figura 3).

De modo geral, o melhor modelo para se determinar o percentual de conídios não germinados em função da concentração, para *P. sanguineus* foi o logarítmico ($R^2=0,97$) do extrato H-Q (Figura 4), para *L. crinitus* o logarítmico ($R^2=0,91$) do extrato H2O-Q (Figura 5) e para o consórcio o geométrico ($R^2=0,98$) do extrato H2O-F (Figura 6).

Tabela 2: Equações de regressão para percentagem de germinação.

Extrato	<i>P. sanguineus</i>	<i>L. crinitus</i>	Consórcio
H2O-Q	Geométrica $Y' = 29,5777 * X^{0,1148}$ $r^2 = 94,43\%$	Logarítmica $Y' = 9,3600 + 3,5004 * \ln(X)$ $r^2 = 91,19\%$	Geométrica $Y' = 29,3617 * X^{0,0306}$ $r^2 = 85,12\%$
H2O-F	Geométrica $Y' = 29,3541 * X^{0,0276}$ $r^2 = 60,20\%$	Geométrica $Y' = 30,9081 * X^{0,0032}$ $r^2 = 3,95\%$	Geométrica $Y' = 46,7912 * X^{0,0530}$ $r^2 = 98,74\%$
H2O-US	Geométrica $Y' = 47,9081 * X^{0,1038}$ $r^2 = 42,09\%$	Geométrica $Y' = 2,6446 * X^{0,3474}$ $r^2 = 44,02\%$	Geométrica $Y' = 36,0965 * X^{0,1752}$ $r^2 = 57,81\%$
H-Q	Logarítmica $Y' = 25,2600 + 2,8490 * \ln(X)$ $r^2 = 97,17\%$	Linear $Y' = 32,5129 + 0,0335X$ $r^2 = 86,38\%$	Logarítmica $Y' = 18,8100 + 7,7565 * \ln(X)$ $r^2 = 96,49\%$
H-F	Geométrica $Y' = 35,9453 * X^{0,1512}$ $r^2 = 72,92\%$	Linear $Y' = 37,7195 + (-0,0305)X$ $r^2 = 11,05\%$	Logarítmica $Y' = 24,0600 + 2,2192 * \ln(X)$ $r^2 = 96,01\%$

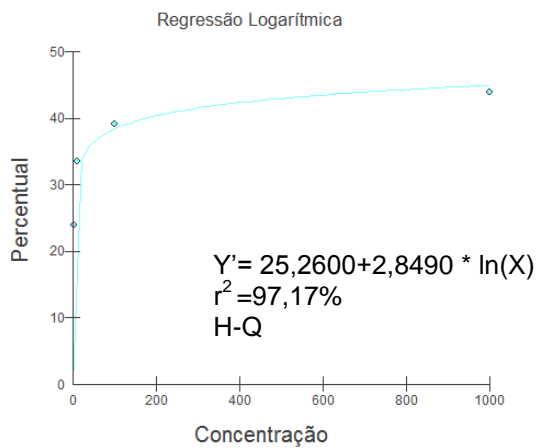


Figura 4: Coeficiente de correlação (R^2) logarítmica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato H-Q de *P. sanguineus* contra *Fusarium* sp.

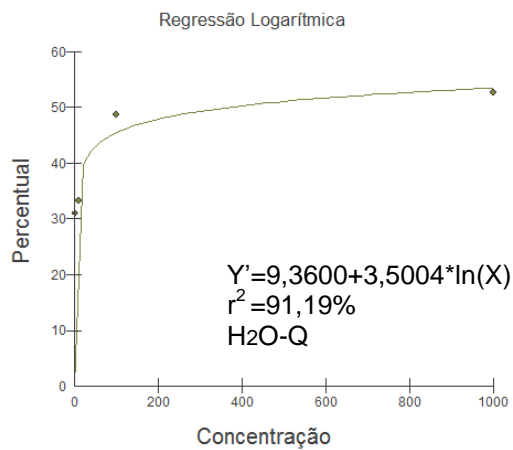


Figura 5: Coeficiente de correlação (R^2) logarítmica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato de H2O-Q de *L. crinitus* contra *Fusarium* sp.

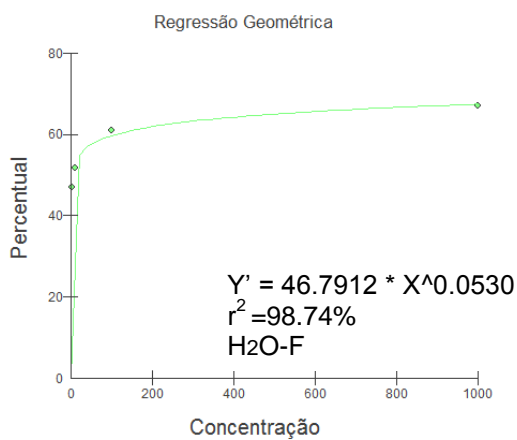


Figura 6: Coeficiente de correlação (R^2) geométrica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato de H2O-F do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* contra *Fusarium* sp.

GERMINAÇÃO DOS ESCLERÓDIOS

Os extratos aquosos obtidos pelo método à quente (H₂O-Q) e o hidroalcolóico à frio (H-F) de *P. sanguineus*, inibiram a germinação em todas as concentrações testadas. Comportamento similar ocorreu para o extrato H₂O-Q em *L. crinitus* onde não houve germinação dos escleródios (Tabela 3). Para os extratos H₂O-US e H-Q de *L. crinitus* na concentração de 1 e 10µg mL⁻¹, também não ocorreu germinação dos escleródios. O percentual máximo de germinação nos extratos de *P. sanguineus* foi de 25% e nos extratos de *L. crinitus* foi de 38%, em relação a testemunha. Os extratos aquosos (H₂O-Q, H₂O-F) e o hidroalcolóico (H-F) do consórcio inibiram totalmente a germinação dos escleródios na concentração de 1000µg mL⁻¹. Por outro lado, o extrato aquoso ultrassônico (H₂O-US) inibiu a germinação em concentrações mais baixa (1 e 10µg mL⁻¹). Observa-se também que no extrato H-Q, em comparação com os outros tratamento, foi onde ocorreu o maior percentual de escleródios germinados (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de germinação dos escleródios, em relação à testemunha, de *Fusarium* sp. em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 µg mL⁻¹.

Fungo	Concentração	H ₂ O-Q	H ₂ O-F	H ₂ O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1µg mL ⁻¹	0	13	13	13	0
	10µg mL ⁻¹	0	13	13	0	0
	100µg mL ⁻¹	0	13	13	25	0
	1000µg mL ⁻¹	0	13	25	0	0
<i>L. crinitus</i>	1µg mL ⁻¹	0	13	0	0	13
	10µg mL ⁻¹	0	13	0	0	38
	100µg mL ⁻¹	0	25	13	13	13
	1000µg mL ⁻¹	0	13	0	13	13
Consórcio	1µg mL ⁻¹	25	25	0	25	25
	10µg mL ⁻¹	50	25	0	38	13
	100µg mL ⁻¹	13	13	50	75	13
	1000µg mL ⁻¹	0	0	50	75	0
Testemunha		100	100	100	100	100

DISCUSSÃO

No presente trabalho, observa-se que os isolados de *P. sanguineus* apresentaram maior efeito inibitório sobre a não germinação de conídios e germinação de escleródios. Uma das hipóteses para explicar tal fato é que alguns isolados podem apresentar maior concentração de substâncias inibitórias ou diferir na composição dessas substâncias conforme sugerido por Tunucci (2004).

Ao que tudo indica a ação dos extratos testados parece estar associada ao tipo de extração utilizada. Ressalta-se, que a produção de extratos brutos provenientes dos carpóforos dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* é um processo que envolve a transferência de massa de um soluto de uma matriz sólida para um solvente. Este tipo de extração é utilizada na recuperação de compostos de interesse, e no caso do uso da água com solvente de elevada polaridade, utilizado pra extração de compostos hidrofílicos. São esses compostos que podem estar atuando no metabolismo fúngico para inibir a germinação de escleródios de *Fusarium* sp à baixa concentração proporcionado pelo extrato aquoso dos fungos testados.

Piccinin (2000), por exemplo, mostrou o efeito inibitório na germinação de *Ezseroliium turacum* e no desenvolvimento micelial de *Colletrochium sublinealum* do extrato aquoso do basidiocarpo de *Lentinula edodes* em concentrações superiores àquelas testadas na presente pesquisa.

Interessantemente para o extrato aquoso a quente de *P. sanguineus* e *L. crinitus* ocorreu a inibição total da germinação dos escleródios de *Fusarium* em todas as concentrações testadas. Jones e Kinghorn (2006) comentam que o calor necessário para realizar esse tipo de extração pode levar à decomposição de compostos termos sensíveis. Para nossos resultados, portanto, podemos inferir que ocorrendo a suposição desses autores para os nossos extratos, ou seja, a decomposição de compostos termosensíveis, estes não teriam nenhuma influência no metabolismo do *Fusarium* para inibir a germinação dos escleródios. Neste caso, os extratos dos diferentes fungos ou teriam compostos similares que poderiam atuar na inibição ou a ação sinérgica de compostos contribuíram para esse comportamento. Ressalta-se, por outro lado, a potencialidade do extrato aquoso do basidiocarpo de *P. sanguineus* na inibição da germinação de esporos de *C. lindemuthianum* (BALDO, 2008).

Quando testou-se o extrato do consórcio de fungos (*P. sanguineus* + *L. crinitus*) aquela inibição total da germinação pelo extrato do fungo *P. sanguineus* isoladamente não ocorreu, ficando a ação entre 15 e 30% de inibição.

Calixto (2001) comenta que a extração hidroalcoólica a frio, possibilita uma extração de distintas categorias de princípios ativos, incluindo substâncias de diferentes grau de polaridade. Nosso resultado mostrou que nesse tipo de extração, o “extrato bruto total” do fungo *P. sanguineus* inibiu a germinação dos escleródios de *Fusarium* sp em todas as concentrações testadas. Resultado contrário foi obtido para o extrato do basidicarpo de *L. crinitus* onde para esse tipo de extração não ocorreu a inibição total para nenhuma das concentrações testadas. Apesar dos extratos terem sido obtidos pelo mesmo tipo de extração, possivelmente há uma quantidade e variedade de compostos presentes que proporcionam esse comportamento diferenciado entre os extratos fungicos.

Embora fuja do escopo do presente trabalho, a determinação de compostos fenólicos presente nos extratos, é importante sua consideração uma vez que há possibilidade de sua ocorrência nos extratos desses basidiocarpos. Há indícios que comprovam a ação antifúngica dos compostos fenólicos e um dos mecanismos pelo qual esta ação pode ocorrer é através da inativação dos sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e síntese de compostos naturais (OLIVEIRA e BADIALE-FURIONG, 2008).

Compostos fenólicos, na sua grande maioria, apresentam natureza na forma de ésteres ou de heterosídeos, que podem ser solubilizados por solventes orgânicos polares ou água (MELLO e SANTOS, 2001). A polaridade do solvente utilizado na extração, o grau de polimerização do composto fenólico, sua interação com outros constituintes e a formação de complexos, determinam a solubilidade do mesmo. Nossos resultados mostram que nas condições de extração, o extrato obtido apresenta maiores teores de compostos com atividade de inibição da germinação de escleródios e germinação de conídios de *Fusarium* sp, que podem ser compostos fenólicos que encontram-se ligados a outros compostos e são extraídos no pH alcalino como ocorreu nas nossas extrações.

A inibição na germinação dos conídios nos extratos aquosos de *P. sanguineus*, o método ultrassônico apresentou o melhor resultado em todas as concentrações testadas. Segundo Luz (1998) o processo ultrassônico apresenta menor percentual de perda por retenção irreversível, significando que extrai

compostos menos complexos e de menor peso molecular, provavelmente devido as ondas ultrassônicas provocarem rompimento de ligações fracas e a consequente redução no tamanho das moléculas extraídas.

O ultra-som é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano. Estas ondas sonoras criam uma única vibração que causa uma variação na pressão no liquido gerando a cavitação (LUZ, 1998). O ultra-som pode ser usado como técnica de extração alternativa ao Soxhlet, e tem sido aplicado para extração de material biológico. A eficiência de extração usando técnica de ultra-som tem sido citada como igual ou melhor que a obtida com o extrator de Soxhlet (ESCRIVA *et al*, 1994). No presente estudo, a eficácia dos extratos obtidos através desse método não apresentou, de modo geral, resultados melhores do que àqueles obtidos com extração com Soxhlet.

Os mesmos resultados, referente à inibição da germinação dos conídios, também foram observados nos tratamentos com extrato aquoso ultrassônico do consorcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus*, porem tais resultados provavelmente deve-se ao fato da presença do carpóforo de *P. sanguineus*, pois o mesmo teste realizado com isolado de *L. crinitus* não tiveram bons resultados no extrato aquoso ultrassônico e sim no extrato aquoso quente.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- Extratos aquosos obtidos pelo método a quente dos carpóforos das cepas amazônicas de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* podem inibir total a germinação de escleródios de *Fusarium* sp. a baixa concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$).
- Extrato ultrassônico (H₂O-US) do consórcio dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* inibe a baixa concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), a germinação dos escleródios de *Fusarium* sp.
- A baixa concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos aquosos a quente e hidroalcolólico de *P. sanguineus* inibem a germinação de escleródios do fitopatógeno *Fusarium* sp.
- Os extratos dos carpóforos das cepas amazônicas de *P. sanguineus* e *L. crinitus* mostraram um percentual de 92% de conídios não germinados de *Fusarium* sp.

REFERENCIAS

- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press, New York. 2005, 952p.
- AZEVEDO, C. P.; FILHO, A. C. C.; HERNZ, G. P.; REIS, A. 2006. Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. *Embrapa Hortaliças*, Brasília.
- BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. 2008. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* por derivados de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 34:94.
- BRASIL. 2011. 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. 2011.
- CALIXTO, J.B. 2001. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Santa Catarina: Ed Argos, 2001,78-91p.
- ESCRIVA, C.; VIANA, E.; MOLTO, J. C.; PICO, Y.; MANES, J. J. 1994. *Chromatogr. A*, 676:375.
- GODOY, P.; COLOMBO, A.L. 2004. Biologia e relevância clínica do gênero *Fusarium* spp. *Prática Hospitalar*, 34:136-140.
- HANLIN, R.T. e MENEZES, M. 1996. *Gêneros Ilustrados de actinomicetos*. Universidade Rural de Pernambuco, Recife. 1996, 274p.
- JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. 2006. *Extraction of plant secondary metabolites*. In: Methods in biotechnology, v. 20, Natural products isolation, 2nd ed. Eds. SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Humana Press Inc., Totowa, 323-351p.
- LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A.; SUMMERELL, B.A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59:107-117.
- LOMASCOLO, A. et al. 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Applied Microbiol.*, 94:618-624.
- LUZ, L. P. da. 1998. *Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 108p.
- MARTINS, M. K. 2005. *Variabilidade de Isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 124p.

MELLO, J. P. C. e SANTOS, S. C. 2001. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre 3ª ed, 2001, 1104p.

NELLY, D. 1978. Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematocides and bactericides. Minnesota: *American Phytopathological Society*. 140.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. 2008. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*, 1: 2: 1-10.

PICCININ, E. 2000. *Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (Lentinula edodes) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Piracicaba, 160p.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 98(7): 967-974.

SANDVEN, P. 2000. Epidemiology of canidemia. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Fórum Micológico, 17:73-81.

STROBEL, G. A, DAISY, B., CASTILLO, U. e HARPER, J. 2004 Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67:257-268.

TAN, R.X. e ZOU, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18:448-459

TRIGIANO, R. N; WINDHAM, M. T e WINDHAM, A. S. 2010. *Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 576p.

TONUCCI, N. M. 2004. *Efeito de extratos aquosos de basidiocarpo e micélio de Lentinula edodes (SHIITAKE) sobre Colletotrichum sublineolum, Alternaria solani, Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae e Tobacco mosaic vírus (TMV)*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 102p.

VALERIANO, V. et al. 2007. Estudos de Indutores para a Produção de Lacase por *Picnoporus sanguineus*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 4(2):112-116.

VANDERLINDE, D. G. 2010. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) MURRILL. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3(1):11-16.

CAPÍTULO III

Potencial de inibição de extratos fungicos frente a germinação de conídios e escleródios do fitopatógeno *FA16 sp.*

Potencial de inibição de extratos fungicos frente a germinação de conídios e escleródios do fitopatógeno FA16 sp.

FIGUEIREDO, Ádrya¹; CASTRO E SILVA, A¹

¹Universidade do Estado do Amazonas-UEA

RESUMO - Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico, e extratos de basidiocarpos têm sido cada vez mais estudados no controle de doenças. Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito fungitóxico dos extratos dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* nativos da região amazônica sobre o fitopatógeno FA16 sp.. Os extratos foram submetidos a ensaios em diferentes concentrações, para avaliar: a) inibição de crescimento micelial, b) inibição da germinação de conídios e c) inibição da germinação de escleródios. Para as avaliações in vitro do crescimento micelial e germinação de escleródios, os isolados foram plaqueados em meio BDA (batata-dextrose-ágar), em fotoperíodo de 12h. A contagem dos esporos foi feita através de microscópio óptico após 16h de incubação. Os resultados demonstram que em todos os experimentos, crescimento micelial, inibição da germinação de conídios e escleródios, no geral os melhores resultados apresentados foram em extratos aquosos se comparados ao hidroalcolico. No crescimento micelial os dados revelaram que os extratos de *P. sanguineus* e *L. crinitus*, tiveram um crescimento reduzido em mais de 90% em relação à testemunha, enquanto que o consórcio desses fungos o melhor resultado foi de 67%. E na germinação dos conídios, os extratos aquosos não houve a germinação de conídios em até 95%, enquanto que extratos hidroalcolicos foi de 41%. Já a inibição da germinação de escleródios, observou-se que não houve germinação nos extratos de *P. sanguineus* em H₂O-Q e H-Q, em extratos de *L. crinitus* em H₂O-Q, H₂O-F e H-F, e no consórcio dos fungos em H₂O-Q, H₂O-F e H-F.

Palavras-chave: Amazônia, basidiomicetos, controle alternativos

ABSTRACT - One of the focuses of alternative agriculture is an alternative control of diseases, which include biological control, and extracts of fruiting bodies have been increasingly studied in disease control. This study aimed to evaluate the antifungal effect of extracts of the fungus *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus crinitus* natives of the Amazon region on the pathogen FA16 sp .. The extracts were tested in different concentrations, to assess: a) inhibition of mycelial growth, b) inhibition of conidial germination and c) inhibition of germination of sclerotia. For evaluation of in vitro mycelial growth and sporulation of sclerotia, the isolates were plated on PDA (potato dextrose agar) medium, with a photoperiod of 12h. The spore count was performed using an optical microscope after 16 hours of incubation. The results show that in all experiments, mycelial growth, inhibition of conidia and sclerotia to sporulation, overall the best results were compared in the aqueous extracts hydroalcoholic. Mycelial growth data showed that extracts of *P. sanguineus* and *L. crinitus* had reduced growth by over 90% compared to control, while the fungi consortium the best result was 67%. And in the sporulation of conidia, the aqueous extracts there was no conidial production by up to 95%, while hydroalcoholic extracts was 41%. Since inhibition of sporulation of sclerotia, it was observed that there was no sporulation in extracts of *P. sanguineus* in H₂O and H-Q, of *L. crinitus* in extract H₂O-Q, H₂O-F and H-F and the consortium of fungi in H₂O-Q-H₂O F and HF.

Keywords: Amazon, basidiomycetes, alternative control

INTRODUÇÃO

O uso intensivo de defensivos na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos pesticidas; o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos; e a redução da biodiversidade. Boa parte dos pesticidas aplicados no campo é perdida, estima-se que cerca de 90% destes não atingem o alvo, sendo dissipados para o ambiente e tendo como ponto final reservatórios de água e, principalmente, o solo. As perdas se devem, de forma geral, à aplicação inadequada, tanto em relação à tecnologia, quanto ao momento de aplicação (BETTIOL *et al*, 2001). Embora os defensivos sintéticos ainda sejam o principal meio de proteção às culturas, o uso de métodos alternativos tem aumentado, em função da necessidade atual de superar problemas como resistência e redução dos riscos de contaminação ambiental provocados pelos produtos sintéticos não-biodegradáveis. A procura por compostos naturais com potencial preventivo e curativo, sem indesejáveis efeitos tóxicos, vem crescendo nas últimas décadas (MOSSINI *et al*, 2006).

A utilização de extratos de basidiomicetos nativos da Amazônia com propriedades antifúngicas destaca-se também como uma potencial alternativa ecológica para substituir a proteção tradicional promovida pela aplicação de fungicidas químicos que pode ser agregada às demais práticas de manejo integrado de doenças e contribuir para atender à crescente demanda internacional e nacional por produtos orgânicos. A flora brasileira é riquíssima em espécies com princípios ativos de importância terapêutica, com potencialidades não apenas de utilização na medicina natural como também na agricultura natural no controle integrado de pragas e doenças de plantas cultivadas (CARVALHO *et al.*, 2002).

Segundo Domingues (2008), os estudos envolvendo a utilização de extratos vegetais de plantas superiores e de fungos, considerados como defensivos alternativos, visando o controle de fitopatógenos, podem contribuir para: o atendimento à crescente demanda por produtos que controlem doenças em culturas não contempladas pela agricultura convencional; a substituição dos fungicidas muito tóxicos por fungicidas com baixa toxidez; o desenvolvimento de uma opção viável de

controle de doenças fúngicas em cultivos orgânicos e ao mesmo tempo; e o desenvolvimento de um método eficaz a ser utilizado em estratégias anti-resistência dentro do manejo integrado de doenças. O estudo da atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de extratos vegetais e fúngicos podem contribuir tanto para o desenvolvimento de uma forma potencial de controle alternativo, quando utilizado diretamente, como numa fonte de substâncias que nas mãos de empresas químicas tornam-se produtos a serem utilizados no controle de doenças fúngicas na agricultura. Sabe-se que muitos metabólitos secundários encontrados nas plantas e fungos possuem funções de defesa contra herbívoros, pragas e patógenos (DOMINGUES *et al.*, 2008).

Porem, ainda que a diversidade dos Basidiomicotas em ecossistemas tropicais seja vasta (HAWKSWORTH, 1991), no Brasil existem poucas pesquisas relacionadas com a utilização de cogumelos ou orelhas de pau para o controle de doenças em plantas, demonstrando a escassez de estudos relacionados ao potencial dos mesmos para ativação de mecanismos de defesas em vegetais (FIORI-TUTIDA, 2003).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo, investigar o potencial *in vitro* dos extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* no controle de fitopatógenos na região do baixo Amazonas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Carpóforos de fungos de basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus*, foram coletados com seus substratos em áreas rurais e periurbana do município de Parintins, região do baixo Amazonas. Em seguida, no laboratório de Biologia do Centro de Estudo Superiores de Parintins-CESPE/UEA, foram triturados em moinho de faca, passado em peneira 60 mesh e pesado 50 gramas de cada, para serem utilizados na obtenção dos extratos aquoso frio (H₂O-F), quente (H₂O-Q) e ultrassônico (H₂O-US), e extratos hidroalcolóxicos a frio (H-F) e quente (H-Q) na proporção de 1:1 (água:etanol). Os métodos utilizados nas extrações foram: 1) a quente, através de extrator Soxhlet, em extração média de 8 horas; 2) extração ultrassônica em ultrassom à temperatura de 50 °C por 25min de extração; e 3) com a solução em repouso por um período de 72h em um recipiente âmbar. Também foi

realizado o consórcio dos fungos, onde foram utilizados 25 gramas do carpóforo triturado de *P. sanguineus* e misturado com 25 gramas do carpóforo triturado de *L. crinitus* (1:1) em 250 ml de solução hidroalcoólica (1:1, água:etanol) para os três métodos de extração: à quente, a frio e ultrassom.

Para o isolamento do fitopatógeno, fragmentos de 8 a 12 cm, de amostras vegetais de hortaliças doentes, foram pesadas e após realizar assepsia foram inoculadas, em fotoperíodo de 12h, em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após o crescimento para a identificação do fitopatógeno, fragmentos das colônias fungicas foram coradas em lactofenol azul algodão e analisados em microscópio óptico para a observação de estruturas reprodutivas, de resistência ou análise da morfologia das hifas (grampos de conexão, septação e etc.) (Hanlin *et al*, 1996).

Os extratos fúngicos obtidos foram dissolvidos previamente em DMSO (dimetil sulfóxido), e adicionados ao meio BDA nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, vertidos em placas de Petri, para realização dos testes: a) crescimento micelial; b) germinação de conídios e c) germinação de escleródios.

No teste do crescimento micelial discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos, foram transferidos para o centro das 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 submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa.

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly *et al* (1978). Dez discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre discos de papel filtro embebidos com 5 mL da solução de cada extrato nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata. Posteriormente, uma gota de suspensão de conídios do fitopatógeno, na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹ foi depositada sobre cada disco de celofane. As placas assim preparadas foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C. A observação foi feita em microscópio óptico após 16h de incubação, considerando-se como germinados, aqueles que apresentassem qualquer indício de formação do tubo germinativo. A avaliação foi feita somando-se os conídios germinados com os conídios não germinados (Nesp), obtendo-se assim

um total de conídios (TC) por placa de Petri, calculando-se assim a percentagem de não germinação ($Nesp \cdot 100/TC$).

Já na avaliação da germinação de escleródios, foram inoculados 10 escleródios em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e cada um dos extratos, nas mesmas concentrações, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial descrito anteriormente. Em seguida incubadas por 72h a 25°C em fotoperíodo de 12h. A avaliação foi feita medindo-se o crescimento radial dos fungos submetidos aos tratamentos, em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa. Em todos os experimentos realizados, tratamentos contendo dimetil sulfóxido e água destilada autoclavada foram utilizados como controle negativo.

Enfim, para a análise estatística dos dados utilizou-se o BioEstat 5.0, onde se obteve os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, teste ANOVA para verificar diferenças entre os tratamentos e de Tukey ($p < 0,05$) para contrastes das médias.

RESULTADOS

CRESCIMENTO MICELIAL

Os isolados de FA16 estudados neste trabalho demonstraram sensibilidade ao efeito dos extratos de *P. sanguineus* e *L. crinitus*, no crescimento micelial, em relação à testemunha (Tabela 1).

Extratos aquosos e H-Q de *P. sanguineus*, apresentaram significativa influencia do crescimento micelial em relação a testemunha, com um crescimento de apenas 8% nos extratos hidroalcolico quente (H-Q) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, comportamento igual apresentado no extrato aquoso ultrassônico (H₂O-US) de *L. crinitus*.

Entre os extratos de basidiomicetos (*P. sanguineus*, *L. crinitus* e o consorcio destes), as melhores média de crescimento foram dos extratos de *P. sanguineus*, onde os aquosos quente (H₂O-Q) e frio (H₂O-F) tiveram os mesmos resultados em todas as concentrações testadas, apresentando crescimento de apenas 25%, em relação à testemunha, nas concentrações 1, 100 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Porém ressalta-se

que além de apresentar os melhores resultados em extratos aquosos, os extrato hidroalcolico frio de *P. sanguineus*, foi o que revelou o maior crescimento micelial em comparação aos demais testes, ultrapassando o percentual de crescimento da testemunha.

Já nos extratos de *L. crinitus* e consórcio dos fungos, os melhores resultados, 17 e 25%, respectivamente, foram em extratos H₂O-US. Os extratos do consórcio foi o que menos teve efeito no crescimento micelial, pois na maioria dos tratamentos o percentual de crescimento foi acima de 50%.

Em geral, os melhores resultados obtidos foram nos extratos aquosos em comparação aos extratos hidroalcolico, que apresentaram os maiores valores de crescimento em todos os extratos e concentrações testadas.

Tabela 1. Percentual do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *FA16* sp., contendo meio de cultura BDA + extratos de basidiomicetos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fungo	Extrato	Tratamentos			
		1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>P. sanguineus</i>	H ₂ O-Q	25	33	25	25
	H ₂ O-F	25	33	25	25
	H ₂ O-US	42	25	33	25
	H-Q	50	75	8	17
	H-F	117	100	67	58
<i>L. crinitus</i>	H ₂ O-Q	25	25	33	33
	H ₂ O-F	42	33	33	33
	H ₂ O-US	33	17	8	25
	H-Q	83	42	58	42
	H-F	25	67	67	42
Consórcio	H ₂ O-Q	67	67	58	50
	H ₂ O-F	58	42	33	42
	H ₂ O-US	33	25	33	25
	H-Q	67	50	58	58
	H-F	50	42	50	33
	Testemunha	100	100	100	100

GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

A atividade antifúngica das diferentes concentrações dos extratos de basidiomicetos foi avaliada microscopicamente, pela observação por meio da inibição da germinação dos conídios do fungo fitopatogênico. Os resultados mostraram que em todos os extratos H₂O-F não houve germinação dos conídios em percentual acima de 95%. Em geral os melhores resultados foram os extratos do consórcio dos fungos, onde em H₂O-Q, H₂O-F e H-Q foram os que menos germinaram. Extratos H₂O-Q de *P. sanguineus* foram os que mostraram maior percentuais de conídios não germinados, nas concentrações 1, 10 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o maior percentual ocorreu no extrato H₂O-F. Na maior concentração testada observou-se diferença significativa dos extratos aquosos em relação aos hidroalcoólicos, onde no primeiro o percentual de conídios não germinados chegam a 95%, enquanto que nos extratos hidroalcoólicos valores chegam somente a 40% (Figura 1).

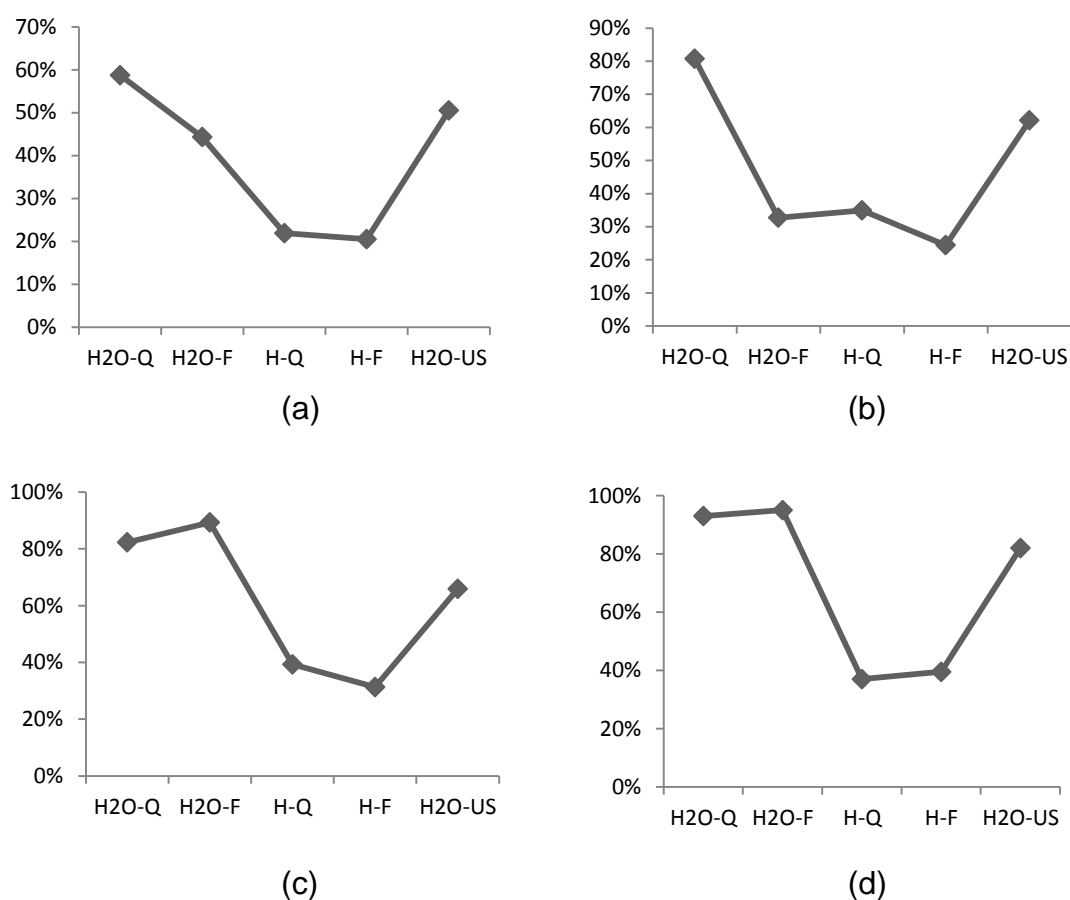


Figura 1 Percentual de conídios não germinados na concentração de (a) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de *P. sanguineus* em diferentes solventes de extração.

Nos extratos aquosos de *L. crinitus* também foram onde ocorreu o maior percentual de inibição de germinação dos conídios (Figura 2). O extrato aquoso à frio (H₂O-F) na concentração de 1000µgmL⁻¹ apresentou o maior percentual (96%) de conídios não germinados em relação a outras concentrações testadas. Comportamento similar ocorreu para o extrato H₂O-F na mesma concentração de *P. sanguineus*.

Por outro lado, para o extrato hidroalcólico, o maior percentual de conídios não germinados ocorreu na concentração de 100µgmL⁻¹ de extrato de H-Q.

Os percentuais de conídios não germinados no extrato aquoso obtido pelo método ultrassônico foram maiores do que àqueles do extrato hidroalcólico, mas menores do que o aquoso obtidos pelos métodos à frio (H₂O-F) e a quente (H₂O-Q) (Figura 2).

De modo geral, para o extrato hidroalcólico o percentual de conídios não germinados não alcançou a 50% em todos os métodos de extração utilizados, enquanto que para os extratos aquosos obtidos pelo método ultrassônico esse percentual ficou na faixa de 50-70%, com exceção para a menor concentração (1µgmL⁻¹) que apresentou 32% de conídios não germinados.

A melhor performance de inibição de germinação de conídios ocorreu para os extratos aquosos onde aqueles obtido pelo método à frio na concentração de 1000µgmL⁻¹, alcançou 96% de inibição.

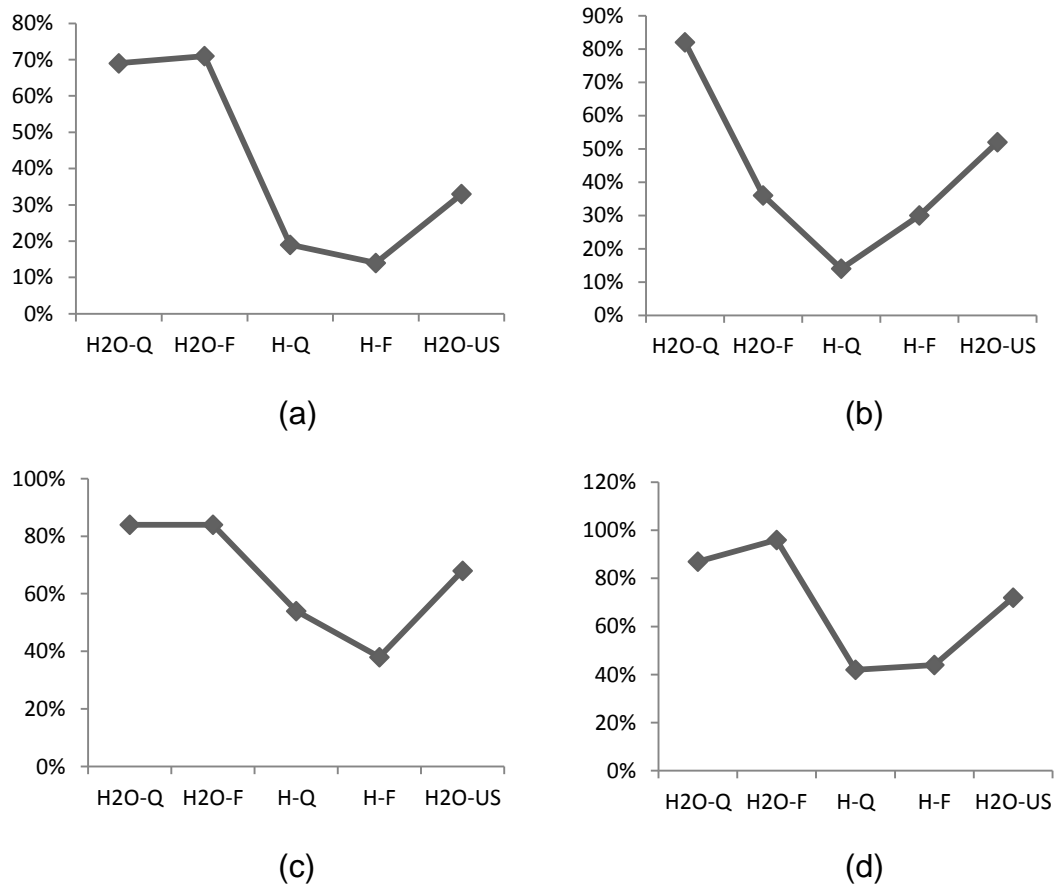


Figura 2 Percentual de conídios não germinados na concentração de (a) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos de *L. crinitus* em diferentes solventes de extração.

Os extratos brutos obtidos para o consórcio dos *P. sanguineus* e *L. crinitus*, apresentaram percentual de inibição de germinação de conídios acima de 90% para os extratos aquosos (H2O-Q e H2O-F) e o hidroalcolólico frio na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nas demais concentrações o extrato hidroalcolólico quente (H-Q) apresentou percentagem de inibição que variou de 70-92% (Figura 3).

Para o extrato aquoso obtido pelo método ultrassônico o percentual de inibição de germinação de conídios não alcançou 50% em todas as concentrações. Comportamento um tanto diferente quando os extratos são avaliados individualmente por este método de extração. Neste caso, o H2O-US (extrato aquoso ultrassônico) do fungo *P. sanguineus*, por exemplo, apresentou 80% de inibição de germinação de conídios na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o extrato do *L. crinitus* 70% na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

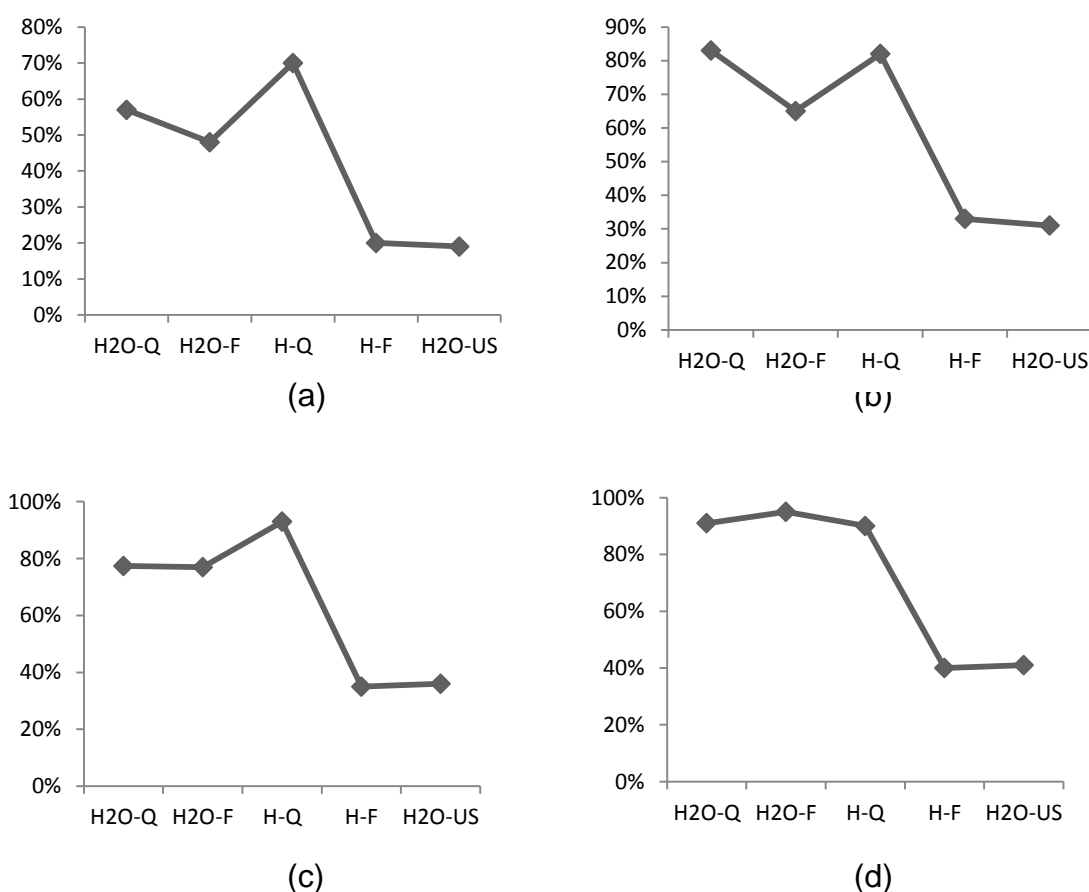


Figura 3 Percentual de conídios não germinados na concentração de (a) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em extratos do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* em diferentes solventes de extração.

A tabela 2 mostra modelos estatísticos testados para verificar a possível relação existente entre concentração e percentual de conídios ao germinados. O modelo geométrico ($Y' = a \cdot x^b$) para extrato hidroalcolico a frio (H-F) do *P. sanguineus* foi o que apresentou o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 99,48\%$) para a relação concentração e percentual de conídios não germinados (Figura 4). Ressalta-se entretanto, que outros modelos para diferentes extratos também obtiveram R^2 muito próximo desse ótimo obtido para carpóforo de *P. sanguineus* sob extração hidroalcolica a frio (H-F). O método ultrassônico foi que apresentou o melhor R^2 para o extrato aquoso do *P. sanguineus* e *L. crinitus* nos modelos geométricos e logarítmico respectivamente, mostrando existir uma forte correlação entre as variáveis (Figuras 4 e 5).

O maior R^2 para o consórcio dos fungos foi obtido com o modelo logarítmico ($Y' = a + b \cdot \ln(X)$) para o extrato aquoso a frio (H₂O-F) (Figura 6) indicando uma forte relação entre as variáveis nesse extrato do consórcio testado.

Tabela 2: Equações de regressão para percentagem de germinação em função das concentrações.

Extrato	<i>P. sanguineus</i>	<i>L. crinitus</i>	Consórcio
H ₂ O-Q	Logarítmica $Y' = 4.5384 + 63.0000 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 87.86\%$	Logarítmica $Y' = 72.0100 + 4581 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 84.14\%$	Logarítmica $Y' = 62.7100 + 4.1736 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 73.52\%$
H ₂ O-F	Logarítmica $Y' = 33.9600 + 9.1028 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 73.72\%$	Linear $Y' = 61.7831 + 0.0362X$ $r^2 = 44.96\%$	Logarítmica $Y' = 48.4100 + 6.6490 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 99.41\%$
H ₂ O-US	Geométrica $Y' = 51.0916 \cdot X^{0.0662}$ $r^2 = 95.98\%$	Logarítmica $Y' = 36.0500 + 5.7978 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 93.63\%$	Logarítmica $Y' = 20.5200 + 3.1790 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 95.11\%$
H-Q	Geométrica $Y' = 25.2914 \cdot X^{0.0752}$ $r^2 = 65.14\%$	Geométrica $Y' = 15.9879 \cdot X^{0.1599}$ $r^2 = 54.73\%$	Logarítmica $Y' = 72.8600 + 3.1095 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 80.22\%$
H-F	Geométrica $Y' = 20.1103 \cdot X^{0.0963}$ $r^2 = 99.48\%$	Logarítmica $Y' = 16.6600 + 4.2604 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 93.44\%$	Logarítmica $Y' = 22.8500 + 2.6275 \cdot \ln(X)$ $r^2 = 88.48\%$

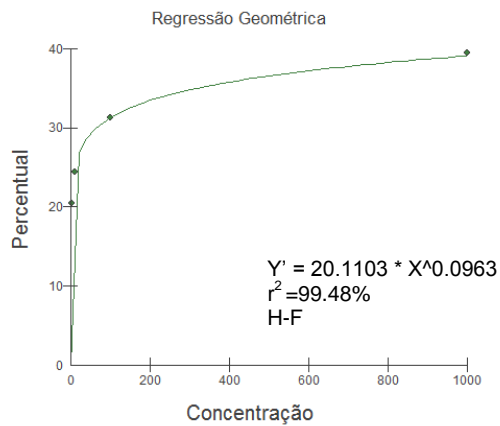


Figura 4: Coeficiente de correlação (R^2) geométrica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato H-F de *P. sanguineus* contra FA16.

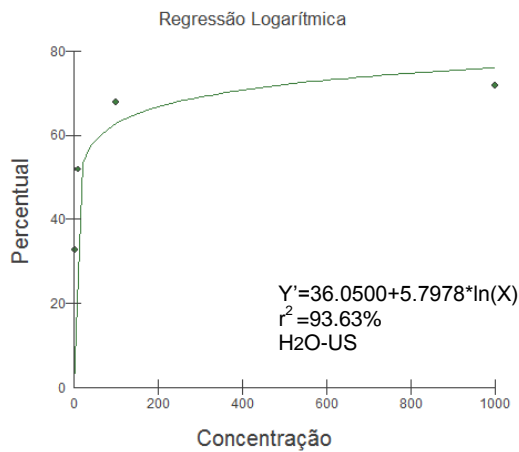


Figura 5: Coeficiente de correlação (R^2) logarítmica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato H2O-US de *L. crinitus* contra FA16

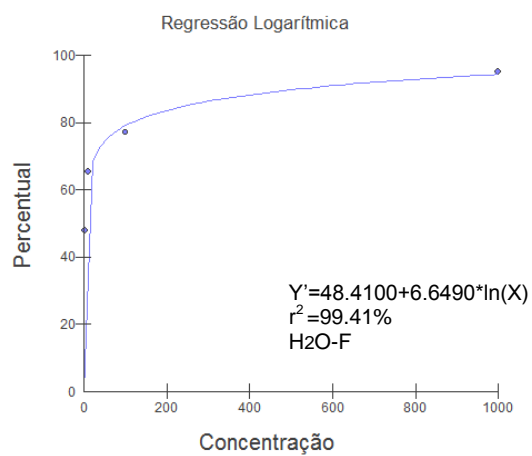


Figura 6: Coeficiente de correlação (R^2) logarítmica obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extrato H2O-F do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* contra FA16.

GERMINAÇÃO DOS ESCLERÓDIOS

No extrato aquoso a quente (H₂O-Q) de *L. crinitus* não ocorreu germinação dos escleródios do fungo FA16 em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 3). Para outros extratos desse fungo, resultado similar foi observado para H₂O-US nas concentrações de 1 e 10 µg mL⁻¹, e extrato H-F na concentração 10⁴mg mL⁻¹.

Nos extratos de *P. sanguineus* não houve germinação do fitopatógeno nos extratos feitos a quente, onde na extração aquosa (H₂O-Q) a inibição da germinação dos escleródios ocorreu nas concentrações 10 e 1000 µg mL⁻¹, e na extração hidroalcolica H-Q, a inibição ocorreu nas concentrações 1, 10 e 1000 µg mL⁻¹.

Já os extratos do consórcio desses fungos a inibição ocorreu somente na maior concentração dos extratos H₂O-Q, H₂O-F e H-F, e de forma geral, extratos do consorcio de fungos foram os que apresentaram os maiores percentual de germinação, em relação a testemunha (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de germinação dos escleródios, em relação a testemunha, de FA16, em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 µg mL⁻¹.

Fungo	Concentração	H ₂ O-Q	H ₂ O-F	H ₂ O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1 µg mL ⁻¹	13	38	25	0	13
	10 µg mL ⁻¹	0	38	25	0	13
	100 µg mL ⁻¹	13	13	25	38	13
	1000 µg mL ⁻¹	0	13	25	0	13
<i>L. crinitus</i>	1 µg mL ⁻¹	0	25	0	13	38
	10 µg mL ⁻¹	0	25	0	38	38
	100 µg mL ⁻¹	0	25	13	38	13
	1000 µg mL ⁻¹	0	25	0	38	0
Consórcio	1 µg mL ⁻¹	25	25	38	13	25
	10 µg mL ⁻¹	50	25	38	38	13
	100 µg mL ⁻¹	25	25	38	25	13
	1000 µg mL ⁻¹	0	0	50	25	0
Testemunha		100	100	100	100	100

DISCUSSÃO

A utilização dos extratos de *P.sanguineus* e *L.crinitus*, para combater o fitopatógeno FA16, demonstrou que o processo de extração e o tipo de solvente utilizado podem otimizar o efeito do mesmo em tratamentos de inibição do crescimento micelial, germinação de conídios e escleródios, Os resultados mostraram que os extratos aquosos tiveram os melhores resultados em comparação com o hidroalcolico.

A potencialidade dos extratos aquosos foi relatado por Baldo (2008a), que constatou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P sanguineus*, inibiram a germinação de esporos de *C. lindemuthianum* em até 97%, e comparou que seus resultados estavam muito próximo ao dos fungicida acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i. a. L⁻¹) e azoxystrobin (4 g i.a. L⁻¹). Assi (2005) também realizou o mesmo teste e observou que extratos aquosos de basidiomicetos reduziram a germinação *in vitro* de esporos de *C. lindemuthianum*, alcançando inibições de até 96%

Baldo *et al.* (2008b) observaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P.sanguineus* nas concentrações 5, 10, 15 e 20 % inibiram significativamente ($P<0,05$) a germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus* e *Phakopsora euvitis*, sendo que o extrato a 5% inibiu em 78,8 % a germinação de *P. euvitis* e a 20% inibiu em 72,9% a germinação de *U. appendiculatus* em relação a testemunha água. Viecelli *et al.* (2008) verificaram que extratos de micélio de *P. sanguineus* a partir da concentração 5% inibiram significativamente a germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola*, enquanto extratos de basidiocarpos e de filtrado de cultura de *P. sanguineus* não apresentaram efeito significativo.

Quanto à utilização de carpóforos de *L. crinitus*, poucos trabalhos foram realizados com a utilização do mesmo no controle de doenças de plantas. Ressalta-se porem que os resultados demonstraram que o mesmo possui potencial antifúngico, pois inibiu a germinação de conídios em até 96%, e a germinação dos escleródios em todas as concentrações testadas do extrato aquoso quente.

Os basidiomicetos produzem uma ampla gama de produtos naturais desde componentes estruturais com atividade antitumoral e imunologicamente ativos até agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, citostáticos, enzimas, reguladores de crescimento e aromas (KUES *et al*, 2000; SUAY *et al* 2000). E devido a esta potencialidade dos compostos bioativos dos basidiomicetos, também foram

realizados testes com extratos do consorcio dos fungos *P.sanguineus* e *L.crinitus*, com intuito que na mistura dos compostos obtivéssemos melhores resultados nos testes aplicados, do que si aplicados individualmente. Porem os dados demonstrou que apesar de terem havidos bons resultados na inibição do fitopatógeno, os mesmo foram equivalentes aos extratos individuais dos fungos.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Extratos obtidos de carpóforos de cepas fungicas amazônicas tem potencial para inibir germinação de escleródios e conídios do fitopatógeno FA16 coletado em hortaliças;
- Em baixa concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato aquoso do carpóforo da cepa amazônica de *Lentinus crinitus*, obtidos a quente, inibiu totalmente a germinação de escleródios do fitopatógeno FA16;
- O percentual de conídios não germinados do fitopatógeno FA16 alcançou a 96% na concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, no extrato aquoso a frio de *L. crinitus*;
- Assim como o *L. crinitus*, mas em extrato hidroalcolico a quente, a cepa amazônica de *Pycnoporus sanguineus* também inibiu, em baixa concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), a germinação de escleródios do fitopatógeno FA16;
- Nenhum dos extratos testados dos fungos *P. sanguineus* e *L. crinitus* inibiu totalmente o crescimento micelial do fitopatógeno FA16;
- O crescimento dos fungos inibiu totalmente a germinação de escleródios do fitopatógeno FA16 nos extratos aquosos (quente e frio) e no hidroalcolico ambos na concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$,

REFERENCIAS

ASSI, L. *Controle de Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (Phaseolus vulgaris L.) pelo extrato do cogumelo Pycnoporus sanguineus (L. ex. Fr.)*. Dissertação Mestrado Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2005. 51 p.

BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* por derivados de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 94, 2008a.

BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 94, 2008b.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: UFRPE, *Imprensa Universitária*, 2001. p. 1-13.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T. de; OLIVEIRA, E. F. de; SANTOS, E. S. do. *Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (Dioscorea sp.) no nordeste*. In: Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, 2., 2002, João Pessoa. Anais João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, 2002. 7p.

DOMINGUES, R. J. *Potencial fungicida "in vitro" de extrato de plantas e de basidiomicetos sobre Alternaria solani (Ell. & Martin) Jones & Grout, Colletotrichum acutatum Simmonds e Sclerotium rolfsii Sacc.* São Paulo: Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008.

DOMINGUES, R. J.; YOUNG, M. C. M.; TÖFOLI, J. G.; MATHEUS, D. R. *Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre Colletotrichum acutatum, Alternaria solani e Sclerotium rolfsii. In: DOMINGUES, R. J. Potencial fungicida “in vitro” de extratos de plantas e de basidiomicetos sobre Alternaria solani (Ell. & Martin) Jones & Grout, Colletotrichum acutatum Simmonds e Sclerotium rolfsii Sacc. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais). Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo – SP. p. 30-49.*

FIORI-TUTIDA, A.C.G. *Uso de extratos dos Cogumelos Lentinula edodes (Berk.) Pegler e Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinem no controle in vitro de Puccinia recondita f. sp tritici e na indução de resistência em trigo à Bipolaris sorokiniana. Maringá, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, 2003.*

HANLIN, R.T. e MENEZES, M. *Gêneros Ilustrados de actinomicetos. Universidade Rural de Pernambuco, Recife. 1996, 274p.*

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation, *Mycology Research*, v.5, p.641-655, 1991.

MOINO Jr., A.; ALVES, S.B. Efeito de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Scientia Agrícola*, v.56, n.1, p. 217-224, Piracicaba, 1999.

KÜES, U. & LIU, K. Fruiting body production in Basidiomicetos. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.54, n. 2, p.141-152, 2000.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. *A árvore Nim (Azadirachta indica A. Juss): Múltiplos Usos. In: MOSSINI, S. A. G. Efeitos de extratos de Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) na produção de micotoxinas e na morfologia de fungos toxigênicos. 2006. 36 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR. p. 1-13.*

NELLY, D. *Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematicides and bactericides*. 140 p. Minnessota: American Phytophathological Society. 1978.

PENTEADO, S. R. 2001. Defensivos alternativos e naturais – “para uma agricultura saudável”. *Ed. Grafimagem*, Campinas.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. & CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira* 28: 54-56, 2003

SUAY, F. *et al.* Screening of Basidiomicetos for antimicrobial activities. *Antonie Van Lewwenhoek*. v.78, p.129-139, 2000.

VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Efeito *in vitro* de extratos de *Pycnoporus sanguineus* sobre *Pseudocercospora griseola*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 52, 2008.

SUGESTÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes sugestões e recomendação:

- Recomenda-se a repetição do experimento *in vivo* para confirmar a metodologia sugerida;
- Repetir os testes em maiores concentrações;
- Fazer análise físico-química dos compostos dos basidiomicetos estudados, nos diferentes tipos de extração;

APÊNDICE 1

Tabela 1: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *Fusarium* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *P. sanguineus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 μ gmL⁻¹.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H ₂ O-Q	Tratamentos	3	0,14	0,047	0,5144	0,68
	Erro	24	2,177	0,091		
	Total	27	2,317			
H ₂ O-F	Tratamentos	3	0,498	0,166	1,9815	0,1427
	Erro	24	2,011	0,084		
	Total	27	2,509			
H ₂ O-US	Tratamentos	3	0,576	0,192	1,604	0,2137
	Erro	24	2,871	0,12		
	Total	27	3,447			
H-Q	Tratamentos	3	5,643	1,881	3,553	0,0289
	Erro	24	12,706	0,529		
	Total	27	18,349			
H-F	Tratamentos	3	0,157	0,052	0,4726	0,7078
	Erro	24	2,66	0,111		
	Total	27	2,817			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

Tabela 2: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *Fusarium* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *L.crinitus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H ₂ O-Q	Tratamentos	3	0,467	0,156	0,9416	0,5621
	Erro	24	3,966	0,165		
	Total	27	4,433			
H ₂ O-F	Tratamentos	3	0,293	0,098	0,4611	0,7155
	Erro	24	5,074	0,211		
	Total	27	5,367			
H ₂ O-US	Tratamentos	3	0,613	0,204	1,8187	0,1697
	Erro	24	2,694	0,112		
	Total	27	3,307			
H-Q	Tratamentos	3	0,846	0,282	0,3937	0,7615
	Erro	24	17,183	0,716		
	Total	27	18,029			
H-F	Tratamentos	3	0,707	0,236	2,6143	0,0735
	Erro	24	2,163	0,09		
	Total	27	2,87			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

Tabela 3: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *Fusarium* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *P. sanguineus* e *L. crinitus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H ₂ O-Q	Tratamentos	3	0,219	0,073	0,5045	0,6865
	Erro	24	3,466	0,144		
	Total	27	3,685			
H ₂ O-F	Tratamentos	3	0,074	0,025	0,2301	0,8749
	Erro	24	2,583	0,108		
	Total	27	2,657			
H ₂ O-US	Tratamentos	3	1,157	0,386	3,2175	0,04
	Erro	24	2,877	0,12		
	Total	27	4,034			
H-Q	Tratamentos	3	0,494	0,165	0,5633	0,6482
	Erro	24	7,02	0,293		
	Total	27	7,514			
H-F	Tratamentos	3	0,746	0,249	1,5854	0,218
	Erro	24	3,763	0,157		
	Total	27	4,509			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

APÊNDICE 2

Tabela 4: Contagem da média de conídios de *Fusarium* sp. não germinado em 16h de incubação, em diferentes concentrações de extratos bruto dos fungos. Números em parênteses indicam valores mínimo e máximo.

Fungo	Concentração	H2O-Q	H2O-F	H2O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.93 ^a (1-2)	2.73 ^b (1-8)	1.43 ^a (1-3)	4.23 ^c (1-11)	0.83 ^a (1-2)
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.87 ^{ab*} (1-2)	2.07 ^{a*} (1-5)	3.23 ^{ac*} (1-8)	4.97 ^b (1-14)	1.93 ^{a*} (1-5)
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.63 ^{ab*} (1-9)	3.37 ^{a*} (1-11)	2.60 ^a (1-6)	5.40 ^b (2-13)	2.20 ^a (1-6)
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.60 ^{a*} (1-4)	1.87 ^a (1-5)	2.77 ^{ac*} (1-4)	6.30 ^b (2-10)	2.63 ^{ab*} (1-4)
<i>L. crinitus</i>	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.20 ^{ab} (1-8)	3.83 ^{ac} (3-7)	0.27 ^a (1-2)	4.10 ^{ad} (1-14)	2.10 ^{ae} (1-8)
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.07 ^{b*} (1-3)	3.90 ^a (1-6)	4.57 ^a (1-15)	3.53 ^{a*} (1-7)	22.08 ^c (7-29)
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.37 ^{ab*} (1-3)	3.07 ^b (1-5)	0.87 ^a (1-5)	5.13 ^c (1-12)	0.10 ^{a*} (1-1)
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.93 ^{ab} (1-3)	3.37 ^{ac*} (1-11)	7.83 ^a (1-15)	6.23 ^{ad*} (1-13)	2.37 ^{ae} (1-16)
Consórcio	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5.77 ^{b*} (3-10)	2.13 ^a (1-4)	1.03 ^a (1-3)	0.53 ^a (1-3)	7.93 ^{c*} (1-17)
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5.03 ^{ab} (3-8)	1.47 ^{ac*} (1-4)	3.33 ^{a*} (1-11)	0.87 ^{ad} (1-2)	6.50 ^{ae} (2-19)
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5.50 ^{b*} (1-11)	1.57 ^a (1-4)	2.83 ^{a*} (1-8)	1.40 ^a (1-3)	9,27 ^c (1-22)
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5.13 ^b (2-11)	2.17 ^a (1-6)	2.50 ^a (1-5)	1.83 ^a (1-3)	8.57 ^c (1-20)

Letras iguais na horizontal significa que não há diferença estatística ao nível de 99% de probabilidade.

*Médias seguidas na horizontal pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% de probabilidade.

APÊNDICE 3

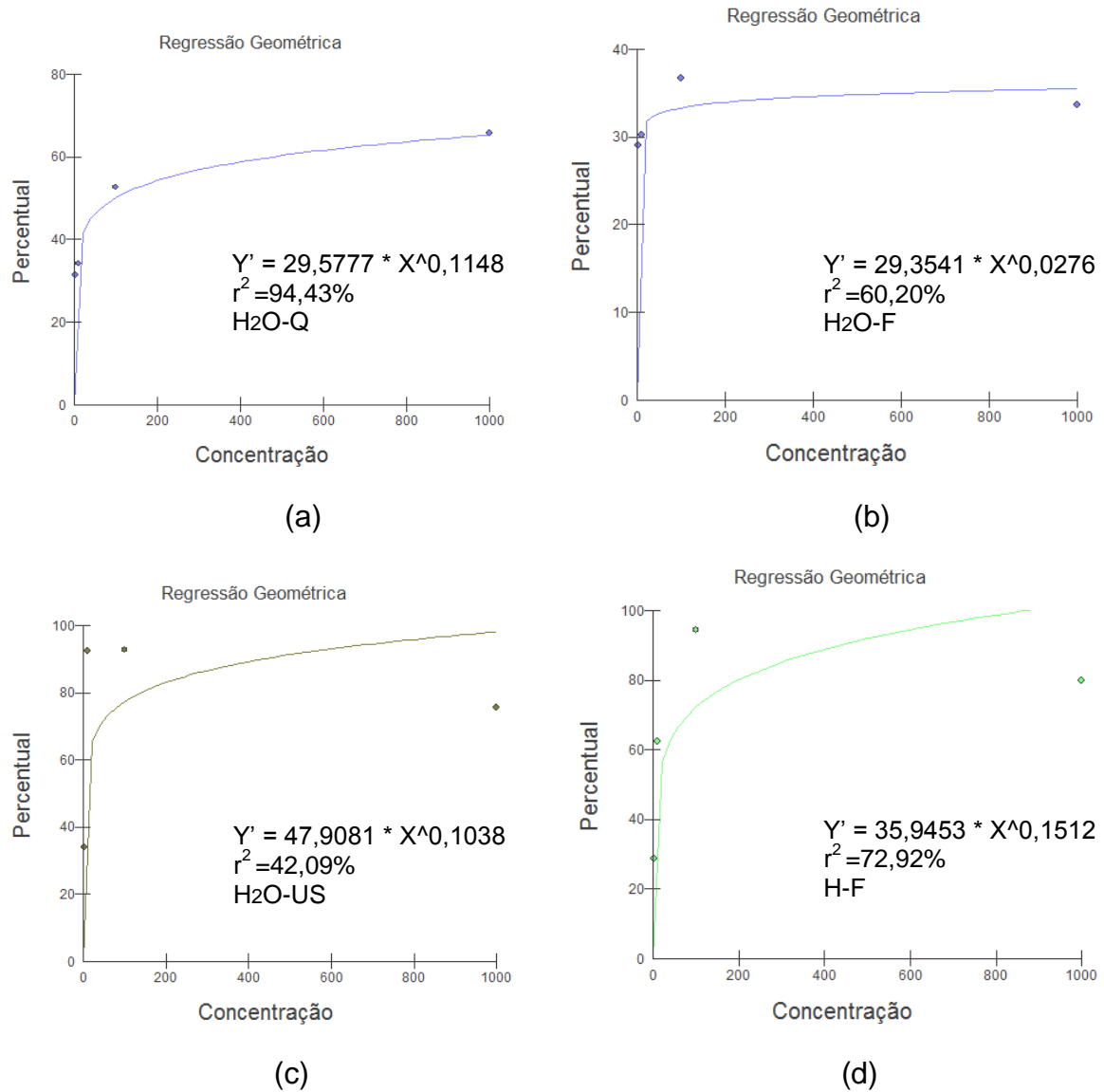
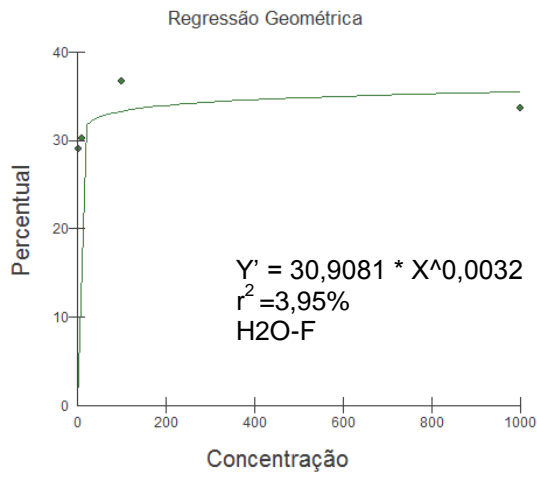
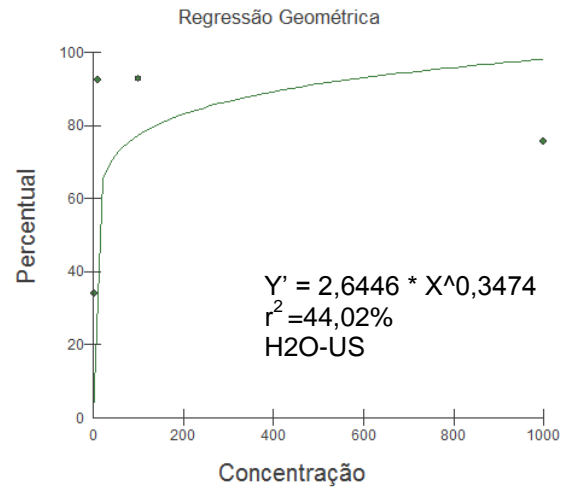


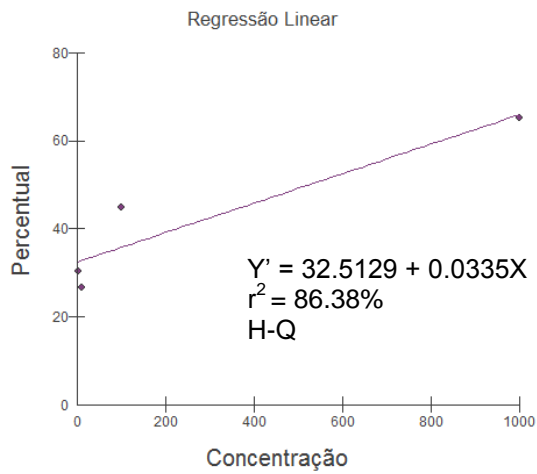
Figura 1: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H2O-US (c) e H-F (d) de *P. sanguineus* contra *Fusarium* sp.



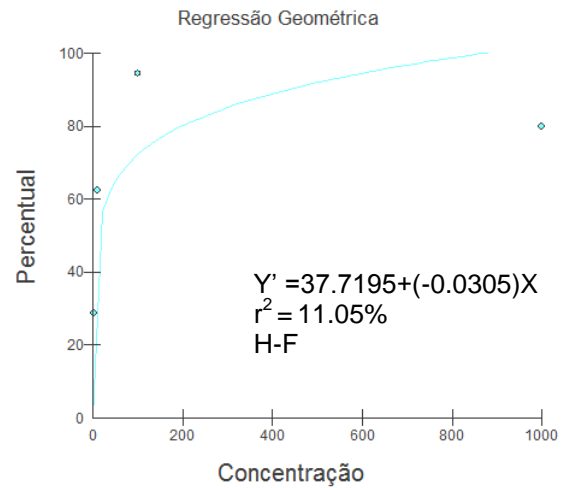
(a)



(b)

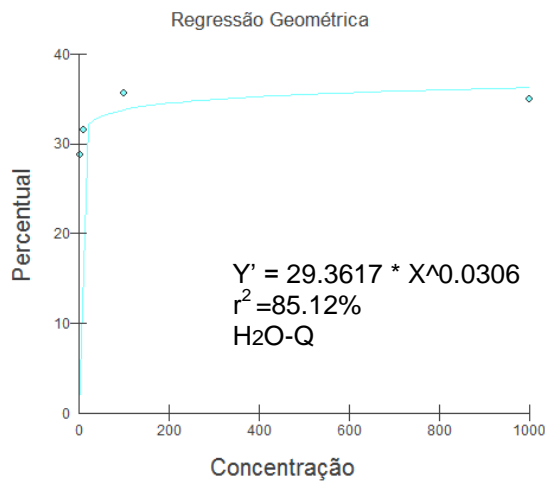


(c)

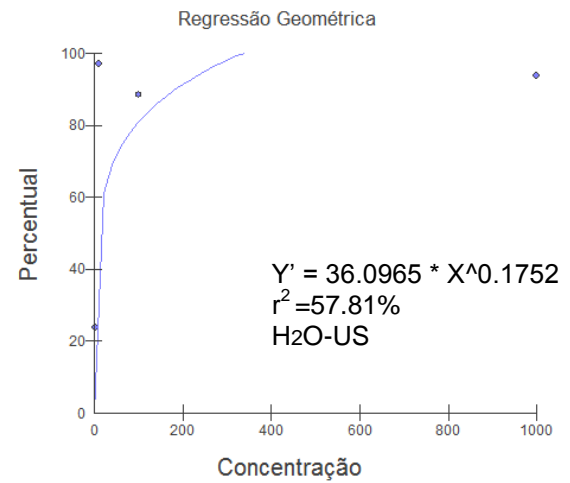


(d)

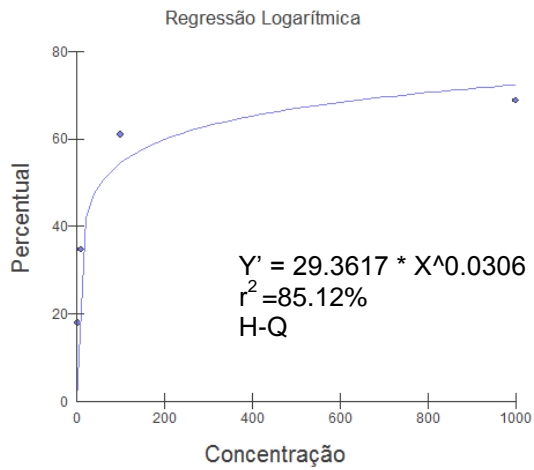
Figura 2: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-F (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) de *L.crinitus* contra *Fusarium* sp



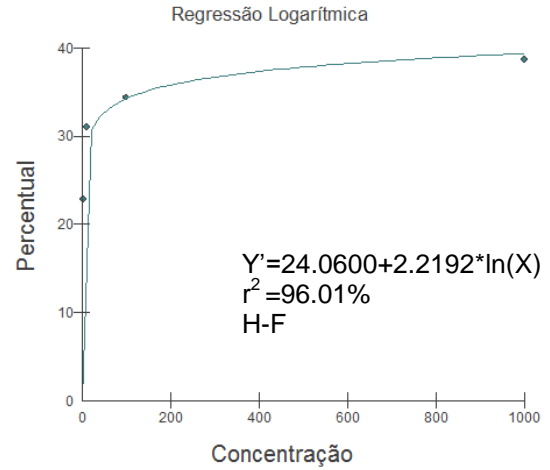
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-Q (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* contra *Fusarium* sp

APÊNDICE 4

Tabela 5. Média de germinação dos escleródios de *Fusarium* sp. em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Fungo	Concentração	H ₂ O-Q	H ₂ O-F	H ₂ O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0,1	0,1	0
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0,1	0	0
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0,1	0,2	0
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0,2	0	0
<i>L. crinitus</i>	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0	0	0,1
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0	0	0,3
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,2	0,1	0,1	0,1
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,1	0	0,1	0,1
Consórcio	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,2	0,2	0	0,2	0,2
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	0,2	0	0,3	0,1
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,1	0,1	0,4	0,6	0,1
	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0	0,4	0,6	0
Testemunha		0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

APÊNDICE 5

Tabela 6: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *FA16* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *P. sanguineus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 μ g mL⁻¹.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H ₂ O-Q	Tratamentos	3	0,107	0,036	1,0000	0,5887
	Erro	24	0,857	0,036		
	Total	27	0,964			
H ₂ O-F	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H ₂ O-US	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H-Q	Tratamentos	3	0.964	0.321	2.4545	0.0867
	Erro	24	3.143	0.131		
	Total	27	4,107			
H-F	Tratamentos	3	1.821	0.607	1.1860	0.3361
	Erro	24	12.286	0.512		
	Total	27	14,107			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

Tabela 7: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *FA16* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *L.crinitus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 μ g mL⁻¹.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H2O-Q	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H2O-F	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H2O-US	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H-Q	Tratamentos	3	0.429	0.143	0.8000	0.5085
	Erro	24	4.286	0.179		
	Total	27	4,715			
H-F	Tratamentos	3	1.286	0.429	2.0000	0.1399
	Erro	24	5.143	0.214		
	Total	27	6,429			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

Tabela 8: Análise da variância do crescimento micelial (cm), em relação à testemunha, de *FA16* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ extratos de *P. sanguineus* e *L. crinitus* na concentração de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Extrato	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Valor de F	Valor de <i>p</i>
H ₂ O-Q	Tratamentos	3	0,393	0,131	0,8462	0,5153
	Erro	24	3,714	0,155		
	Total	27	3,685			
H ₂ O-F	Tratamentos	3	0,107	0,036	1,0000	0,5887
	Erro	24	0,857	0,036		
	Total	27	0,964			
H ₂ O-US	Tratamentos	3	0,00 e 00	0,00 e 00	-4,0000	0,9857
	Erro	24	-7,14 e-41	50,0 e-08		
	Total	27				
H-Q	Tratamentos	3	0,143	0,048	0,2500	0,8612
	Erro	24	4,571	0,190		
	Total	27	4,714			
H-F	Tratamentos	3	0,393	0,131	1,3750	0,2737
	Erro	24	2,286	0,095		
	Total	27	2,679			

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (6 repetições)

APÊNDICE 6

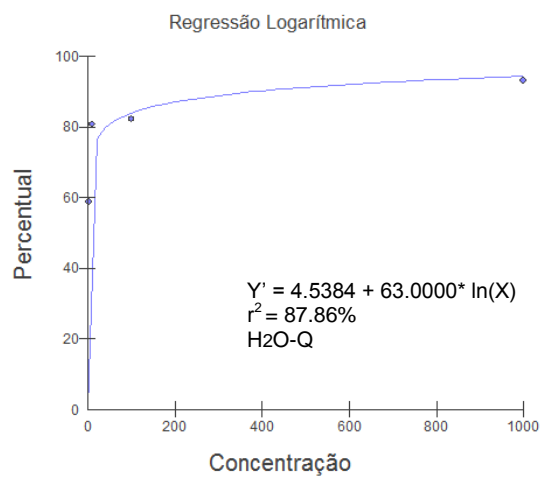
Tabela 9: Contagem da média de conídios de FA16 não germinado em 16h de incubação, em diferentes concentrações de extratos bruto dos fungos. Números em parênteses indicam valores mínimo e máximo.

Fungo	Concentração	H2O-Q	H2O-F	H2O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1µg.mL ⁻¹	5.87 ^{b*} (4-8)	4.43 ^{ab*} (1-9)	3.43 ^a (1-7)	2.63 ^a (1-5)	2.90 ^a (1-5)
	10µg.mL ⁻¹	7.93 ^b (7-9)	3.27 ^{ab*} (1-6)	4.53 ^{a*} (1-10)	3.90 ^a (1-7)	3.23 ^{a*} (1-6)
	100µg.mL ⁻¹	8.23 ^{ab} (7-9)	8.93 ^{ac} (7-10)	5.73 ^a (3-10)	5.07 ^a (2-12)	4.00 ^{ad} (1-7)
	1000µg.mL ⁻¹	9.30 ^{ab} (8-10)	9.53 ^{ac} (8-10)	8.97 ^a (4-14)	5.20 ^{ad} (3-7)	5.27 ^{ae} (1-11)
<i>L. crinitus</i>	1µg.mL ⁻¹	6.90 ^{ab} (2-10)	7.07 ^{ac} (5-9)	0.57 ^{a*} (1-2)	1.93 ^{ad*} (1-6)	1.57 ^a (1-10)
	10µg.mL ⁻¹	8.17 ^b (7-10)	3.60 ^{ab} (1-8)	1.40 ^a (1-4)	1.37 ^a (1-3)	4.27 ^{ac} (1-9)
	100µg.mL ⁻¹	8.43 ^{ab} (7-10)	8.43 ^{ac} (7-10)	1.33 ^d (1-2)	5.40 ^a (1-9)	4.87 ^a (2-8)
	1000µg.mL ⁻¹	8.70 ^a (5-10)	9.63 ^a (9-10)	1.53 ^d (1-4)	4.17 ^b (1-7)	5.63 ^c (2-13)
Consórcio	1µg.mL ⁻¹	4.30 ^b (2-7)	2.80 ^a (1-5)	1.93 ^a (1-5)	6.97 ^c (4-10)	2.37 ^a (1-6)
	10µg.mL ⁻¹	8.30 ^{ab} (6-9)	4.63 ^a (2-6)	3.90 ^a (1-9)	8.20 ^{ac} (6-10)	3.63 ^a (1-7)
	100µg.mL ⁻¹	7.87 (1-10)	6.17 (2-10)	2.83 ^{a*} (1-10)	9.27 (7-10)	4.40 (1-8)
	1000µg.mL ⁻¹	9.10 ^{b*} (7-10)	9.77 ^{c*} (7-12)	4.97 ^{a*} (2-11)	9.00 ^{d*} (7-9)	5.33 ^a (2-9)

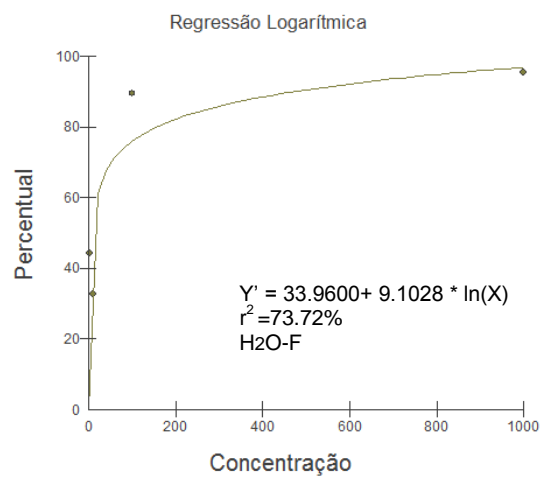
Letras iguais na horizontal significa que não há diferença estatística ao nível de 99% de probabilidade.

* Médias seguidas na horizontal pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% de probabilidade.

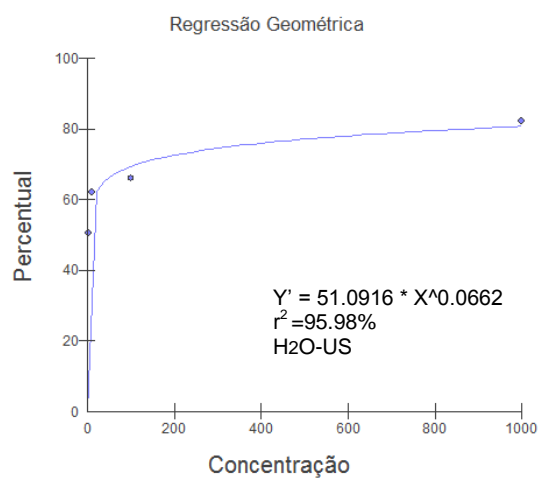
APÊNDICE 7



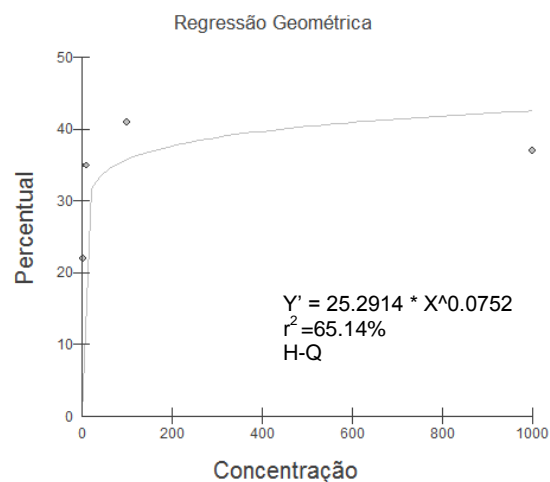
(a)



(b)

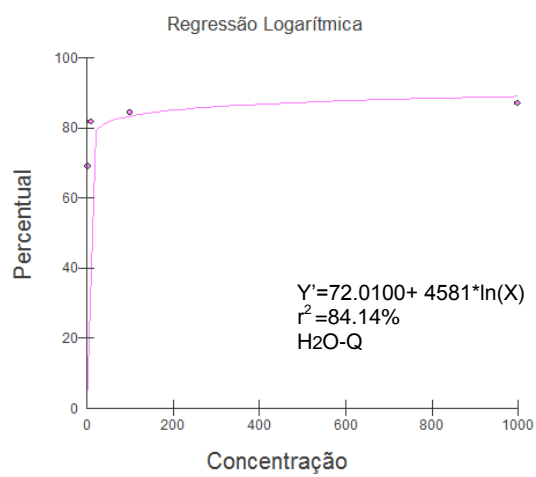


(c)

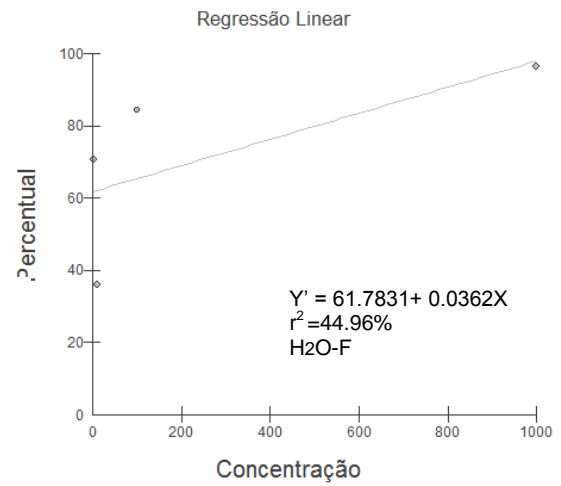


(d)

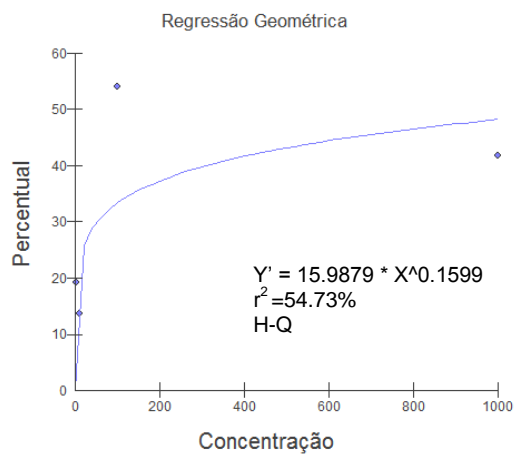
Figura 4: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H2O-US (c) e H-Q (d) de *P. sanguineus* contra *FA16* sp



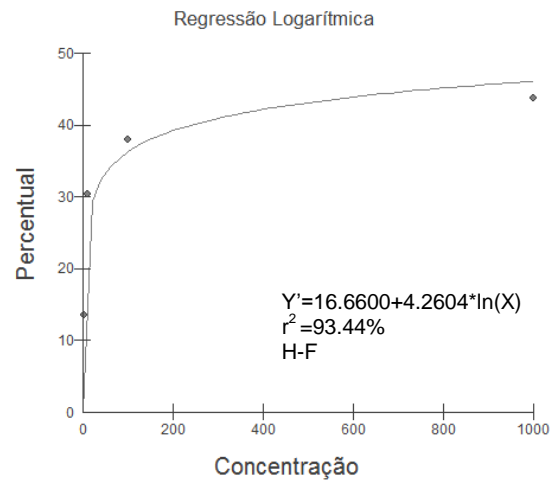
(a)



(b)

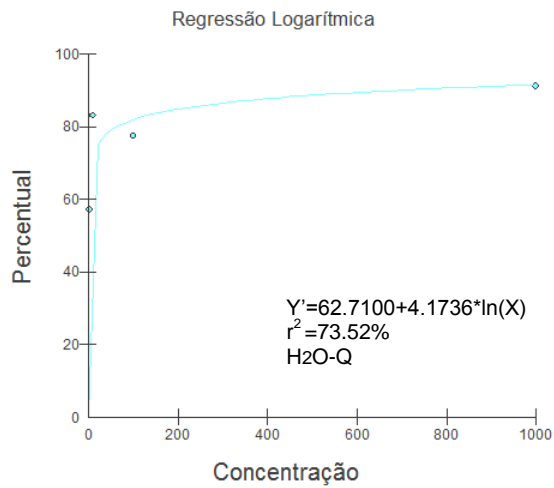


(c)

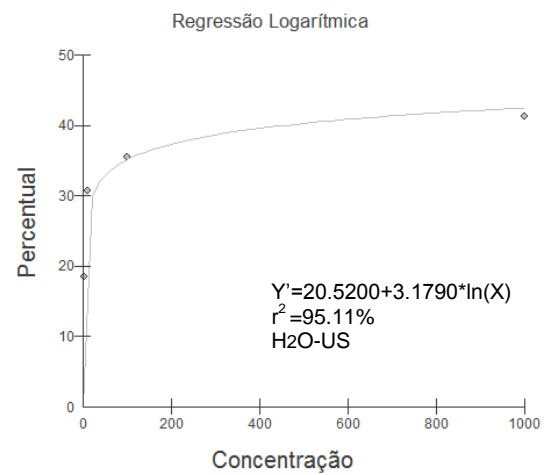


(d)

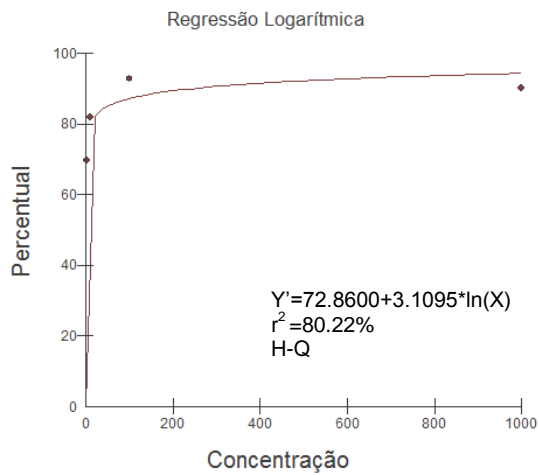
Figura 5: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-Q (a), H2O-F (b), H-Q (c) e H-F (d) de *L. crinitus* contra *FA16* sp



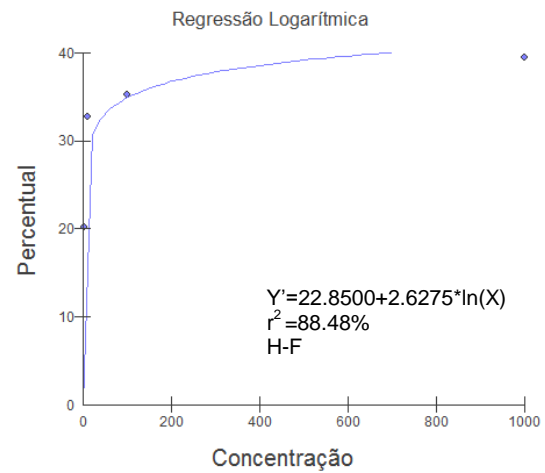
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6: Coeficiente de correlação (R^2) obtido para a relação entre diferentes concentrações e conídios não germinados em extratos H2O-Q (a), H2O-US (b), H-Q (c) e H-F (d) do consórcio de *P. sanguineus* e *L. crinitus* contra *FA16* sp

APÊNDICE 8

Tabela 10. Média de germinação dos escleródios de *FA16*. em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos nas concentrações de 1 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Fungo	Concentração	H ₂ O-Q	H ₂ O-F	H ₂ O-US	H-Q	H-F
<i>P. sanguineus</i>	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,1	0,3	0,2	0	0,1
	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,3	0,2	0	0,1
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,1	0,2	0	0,1
<i>L. crinitus</i>	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,2	0	0,1	0,3
	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,2	0	0,3	0,3
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,2	0,1	0,3	0,1
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,2	0	0,3	0
Consórcio	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2
	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,4	0,2	0,3	0,3	0,1
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0	0,4	0,2	0
Testemunha		0,8	0,8	0,8	0,8	0,8