

RICARDO JOSÉ DOMINGUES

**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.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2008

RICARDO JOSÉ DOMINGUES

**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.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Domingues, Ricardo José
D671p 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. / Ricardo José Domingues -- São Paulo, 2008.
70 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Fungicida. 2. Antracnose. 3. Pinta preta. I. Título

CDU : 632.952

Aos meus pais, minha esposa e meus filhos.

Pelos ensinamentos, amor, carinho e alegria transmitidos ao longo de minha caminhada.

DEDICO

“Não podemos fazer grandes coisas neste planeta, mas podemos fazer pequenas coisas com muito amor e dedicação.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, mas em especial, por ter colocado mais este desafio em minha vida e por ter estado ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço de todo o coração a minha esposa Adriana, meus filhos Paulo Henrique e Mariana pelo amor, carinho, alegria, compreensão e incentivo. Amo muito vocês.

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus pela oportunidade, confiança, orientação, estímulo e paciência dispensados durante o trabalho.

Aos colegas da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica pela acolhida e pelo apoio.

À Dra. Maria Cláudia Young da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pelas orientações, pelo fornecimento dos extratos de plantas nativas e pelo auxílio na elaboração dos extratos de basidiomicetos. Agradeço também ao Ailton pela elaboração dos extratos fúngicos e pela paciência.

À Dra. Joana D'Arc Felício de Souza do Centro de P&D de Sanidade Animal do Instituto Biológico pela amizade, pelos extratos de plantas exóticas comerciais e pelas orientações.

Aos amigos Jesus Töfoli, Teresa Jocys, Armando Reis Tavares e Shoey Kanashiro pela amizade, alegria e incentivo dispensados não só durante a realização desse trabalho.

Aos colegas do Centro de P&D de Sanidade Vegetal pelo apoio, amizade e incentivo.

A todos do Instituto de Botânica e do Instituto Biológico que direta e indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho. Muito obrigado.

Que Deus abençoe a todos.

ÍNDICE

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Doenças fúngicas: aspectos gerais e importância	1
1.2. Controle químico das doenças fúngicas	4
1.3. Potencial de utilização de extratos no controle de doenças fúngicas	6

CAPÍTULO 1

Ação “*in vitro*” de extratos vegetais sobre *Alternaria solani* (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	17
Referências Bibliográficas	21

CAPÍTULO 2

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

Resumo	30
Abstract	31
Introdução	33
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	40
Referências Bibliográficas	43

CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO 1	61
ANEXO 2	68

RESUMO

A utilização de fungicidas é, em muitos casos, a única medida eficiente e viável de controlar doenças e garantir a sustentabilidade da atividade agrícola. Por outro lado, é também uma tecnologia que traz impactos negativos ao ambiente e à saúde pública. Os fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum* causam graves prejuízos às culturas de tomate e morango, respectivamente. *Sclerotium rolfii* é considerado como patógeno de solo, capaz de provocar danos severos a diversas espécies agrícolas de importância econômica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação de extratos etanólicos e hexânicos de oito espécies de plantas fanerógamas de uso comercial, de três espécies de plantas fanerógamas nativas e de dois basidiomicetos nativos sobre a: a) inibição de crescimento micelial desses fitopatógenos, b) inibição da germinação de conídios (*A. solani* e *C. acutatum*) e c) inibição da germinação de escleródios de *S. rolfii*. Dentre os extratos de plantas fanerógamas comerciais, os extratos hexânicos de *Ruta graveolens*, *Allamanda cathartica*, *Impatiens walleriana*, *Allium sativum* e *Lavandula angustifolia* foram os que proporcionaram os menores valores de crescimento micelial dos três fitopatógenos. O extrato hexânico de *A. sativum* foi o único a inibir totalmente a germinação de conídios de *A. solani*. Os extratos hexânicos de *I. walleriana*, *A. sativum* e *L. angustifolia* foram os únicos em que verificou-se ausência total de germinação de conídios de *C. acutatum*. Os extratos hexânicos de *R. graveolens* e de *I. walleriana* inibiram totalmente a germinação de escleródios de *S. rolfii*. Dentre as plantas e basidiomicetos nativos o extrato do fungo *Oudemansiella canarii* foi o mais ativo. Proporcionou a maior inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos, inibiu totalmente a germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e da germinação de escleródios de *S. rolfii*. O extrato de *Irpex lacteus* inibiu parcialmente o crescimento micelial dos patógenos.

Palavras-chave: ação antifúngica, controle alternativo, antracnose, pinta preta, podridão de *Sclerotium*.

ABSTRACT

The use of fungicides is, in many cases, the only efficient and viable measure of to control diseases and to guarantee the sustainability of the agricultural activity. On the other hand, it is also a technology that brings negative impacts to the environment and the public health. The fungi *Anternaria solani* and *Colletotrichum acutatum* cause serious damages to the tomato and strawberry crops, respectively. *Sclerotium rolfsii* is a soil pathogen, capable to provoke hard damages to several agricultural species. The present work had as objective evaluates the action of ethanolics and hexanics extracts of eight commercials vegetable species, three natives vegetables species and two natives basidiomycetes on the: the) inhibition of mycelial growth of those phytopathogens, b) inhibition of the conidial germination (*A. solani* and *C. acutatum*) and c) inhibition of the sclerotial germination of *S. rolfsii*. Among the extracts of commercials vegetable species the hexanics of *Ruta graveolens*, *Allamanda cathartica*, *Impatiens walleriana*, *Allium sativum* and *Lavandula angustifolia* were the ones that provided the smallest values of mycelial growth of the three pathogens. The hexanic extract of *A. sativum* was the only to inhibit the conidial germination of *A. solani*. The hexanics extracts of *I. walleriana*, *A. sativum* and *L. angustifolia* were the only ones in that total absence of conidial germination of *C. acutatum*. The hexanics extracts of *R. graveolens* and *I. walleriana* totally inhibited the sclerotial germination of *S. rolfsii*. Among the natives extracts, the best results were obtained with the extract of *O. canarii*, that provided the smallest values of micelial growth of the three pathogens, beyond to inhibit totally the conidial germination of *A. solani* and *C. acutatum* and sclerotial germination of *S. rolfsii*. The *I. lacteus* extract inhibited the micelial growth of the pathogens partially.

Key words: antifungal action, alternative control, anthracnose, early blight, Sclerotium root rot.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1. DOENÇAS FÚNGICAS: ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA

Doenças de plantas são definidas como uma série de respostas visíveis e invisíveis de células e tecidos da planta à presença de um agente patogênico ou a fatores ambientais que resultam em alterações adversas na forma, função ou integridade da planta que podem resultar em dano parcial, morte da planta ou de partes dela (Kimati 1995; Agrios 1997).

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; 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.

As espécies olerícolas vem sendo muito procuradas pelos consumidores por terem a sua imagem associada a uma alimentação saudável. No entanto, diversas doenças fúngicas podem ocorrer comprometendo a quantidade e a qualidade da produção. Dentre elas destacam-se a “pinta preta” do tomateiro, a “flor preta” do morangueiro e a “podridão de esclerotium”.

Alternaria solani, agente causal da doença conhecida como “pinta preta”, está entre os principais patógenos de folhas, hastes e frutos do tomateiro (Duarte & Albuquerque 1971; Tello Marquina & De La Vega 1995). A doença se expressa através de lesões foliares necróticas, pardo-escuras, com característicos anéis concêntricos e bordos bem definidos. As lesões ocorrem isoladamente ou em grupos, podendo apresentar ou não halo clorótico. Sintomas semelhantes, porém com lesões mais alongadas e deprimidas, ocorrem nos caules e pecíolos (Garbor & Wieb 1997). Nos frutos afetados, verifica-se a presença de manchas escuras, deprimidas e com a presença

típica de anéis concêntricos, que geralmente se localizam na região peduncular do fruto. (Maffia *et al.* 1980; Datar & Mayee 1981; Mizubuti & Brommonschenkel 1996).

A alta severidade da “pinta preta” resulta em intensa redução da área foliar e vigor das plantas, quebra de hastes, queda e depreciação de frutos e até mesmo a morte de plantas (Sherf & Macnab 1986; Vale *et al.* 2000). De maneira geral, os sintomas aparecem primeiramente nas folhas mais velhas e evoluem posteriormente para as partes mais novas da planta (Douglas & Pavék 1972; Messiaen *et al.* 1995). Afeta a produtividade e qualidade de frutos, ocasionando, via de regra, graves prejuízos econômicos (Dorozhin & Invanyuk 1979, Jones *et al.* 1993). Estudo realizado por Basu (1974) demonstrou que a doença, sem a aplicação de fungicidas, pode atingir até 60% da área foliar causando reduções de 10% no tamanho dos frutos e 10 a 30% no número de frutos comerciais.

Entre as medidas de controle da pinta preta destaca-se o uso de sementes e mudas saudáveis (Maffia *et al.* 1980), o tratamento de sementes com fungicidas (Tokeshi & Carvalho 1980), o emprego de espaçamento adequado (Patil 1981), evitar áreas úmidas e irrigações por aspersão (Sherf & Macnab 1986), adubação equilibrada (Blachinski *et al.* 1996), bem como a aplicação de fungicidas na parte aérea (Vale *et al.* 2000; Kurozawa & Pavan 2005).

Outra doença, a “flor preta” é considerada o principal problema fitossanitário da cultura do morangueiro (Passos 1999), podendo causar perdas que variam entre 30 e 68 % (Henz *et al.* 1992). A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, embora *C. fragariae* possa, em pequena escala, produzir sintomas em flores (Tanaka & Passos 1998). *C. acutatum* pode infectar, além das flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e parte superior do rizoma. As flores podem ser infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento, tornando-se necrosadas e marrom-escuras (Tanaka *et al.* 2005).

Foi apenas a partir da década de 80, baseado em estudos feitos por Igarashi (1984), que se passou a considerar a possibilidade de *C. acutatum* ser um dos agentes causais da antracnose do

morangueiro no Estado de São Paulo, o que acabou sendo confirmado mais tarde por outros autores (Henz *et al.* 1992; Dias *et al.* 1994).

A introdução do patógeno em áreas livres da doença é feita, provavelmente, através de mudas contaminadas (Tanaka *et al.* 2005). A partir daí, o fungo poderá sobreviver em restos de cultura no solo, que servirão como fonte de inóculo para os cultivos posteriores (Eastburn & Gubler 1990). A cobertura do solo com plástico preto “mulching” e a irrigação por aspersão, tecnologias largamente empregadas pelos produtores, favorecem a doença. Existe a possibilidade do patógeno poder sobreviver em hospedeiros alternativos como: *Carica papaya*, *Capsicum frutescens*, *Coffea arabica*, *Citrus* spp., *Hevea* spp., *Lycopersicon esculentum*, *Malus sylvestris*, *Persea americana*, *Pinus* spp., *Solanum melongena* e *Zinia* spp. (Tanaka *et al.* 2005).

O emprego de variedades resistentes ainda não é possível, já que as atualmente cultivadas são consideradas suscetíveis. As variedades “IAC Campinas” e “Dover” estão no grupo das que apresentam menor suscetibilidade (Tanaka *et al.* 2000). Adubações pesadas de N e P podem promover um aumento da incidência da doença (Henz & Heifschneider 1990).

Apesar da literatura indicar o controle químico da antracnose, este não pode ser adotado no país devido à inexistência de fungicidas registrados para a patossistema (Brasil 2007b). Isso tem agravado o problema do uso de produtos sem registro, de forma excessiva e indiscriminada, denegrindo a imagem da cultura e prejudicando os bons produtores (Dias 1999).

Sclerotium rolfsii é um organismo que faz parte da microbiota do solo (habitante do solo) e é considerado patógeno causador de podridão de raiz e colo, podendo atacar plantas em todos os seus estádios de desenvolvimento. Caracteriza-se pela inespecificidade em relação ao hospedeiro, podendo até sobreviver no solo na ausência do mesmo, nutrindo-se de matéria orgânica (fase saprofítica). Causa podridão do colo e raízes comprometendo a absorção de água e nutrientes e prejudicando o desenvolvimento das plantas que exibem sintomas reflexos de murcha (Agrios 1997). As plantas mais jovens normalmente são mais sensíveis, podendo morrer rapidamente,

enquanto as mais velhas demoram mais ou até mesmo nem chegam a morrer, mas tem a sua produtividade reduzida (Bedendo 1995; Agrios 1997).

Fungos do gênero *Sclerotium* apresentam hifas septadas, finas, brancas e intensamente ramificadas, formando um micélio abundante, cottonoso e solto. O micélio dá origem aos escleródios, inicialmente pequenos, de cor branca que, durante o seu desenvolvimento, escurecem podendo ser esféricos ou de formato irregular. Tais estruturas são responsáveis pela sobrevivência a condições adversas e disseminação do fungo. *S. rolfsii* não produz esporos e em sua forma perfeita é conhecida como *Aethalium rolfsii*, que produz basidiósporos nas bordas das lesões (Bedendo 1995, Agrios 1997).

O controle de *Sclerotium rolfsii* é considerado bastante difícil em função de tratar-se de um patógeno veiculado pelo solo, um ambiente complexo onde medidas de controle têm sua eficiência bastante prejudicada. Dentre as principais medidas recomendadas podem ser citadas: a rotação de culturas, a utilização de sementes, mudas e material de propagação vegetativa sadios, a aração profunda visando enterrar os restos de cultura e o controle da irrigação evitando o excesso de umidade do solo (Bedendo 1995, Agrios 1997). A solarização, tecnologia que envolve a cobertura do solo com filme plástico para que ele se aqueça através da incidência da radiação solar e assim promova a destruição das estruturas dos patógenos, tem se mostrado eficiente (Ghini & Bettiol 1995). O emprego de produtos químicos (tratamento de solo, de sementes, de estacas ou mudas), pode minimizar os danos. O tratamento de grandes extensões de solo é inviável economicamente (Bedendo 1995).

1.2. O CONTROLE QUÍMICO DAS DOENÇAS FÚNGICAS

A palavra fungicida “*stricto sensu*” (do latim “caedo”=matar + “fungus”=fungo), significa tudo aquilo que é capaz de matar fungos. Dessa forma, calor, ácidos, luz ultravioleta e outros agentes físicos seriam considerados fungicidas. Entretanto, devido ao interesse prático de seu uso no controle de doenças de plantas, o termo fungicida é utilizado de forma restrita a compostos

químicos capazes de prevenir ou atenuar infecções de tecidos de plantas vivas por fungos fitopatogênicos. Dentro deste conceito, substâncias que, sem serem letais, inibem a germinação de esporos e o crescimento miceliano (fungistáticas) e aquelas que, permitindo o crescimento miceliano, inibem a reprodução por esporulação (anti-esporulantes), são consideradas fungicidas (Azevedo 2003).

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* (Dekker & Georgopoulos 1982; Kimati 1995). A partir de então, diversos grupos de substâncias com ação fungicida foram sendo descobertos, desenvolvidos e utilizados comercialmente pelos agricultores. Os mercuriais por volta de 1914, os ditiocarbamatos na década de 30, heterocíclicos nitrogenados em 1949, ftalonitrilas e os primeiros fungicidas sistêmicos (carboxin e benomyl) nos anos 60, os triazóis na década de 70 (Dekker & Georgopoulos 1982; Kimati, 1995) e as estrobilurinas no final dos anos 90 (Azevedo 2003).

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 a obtenção de produtos menos tóxicos (Azevedo 2003, 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 2007b). A utilização inadequada de tais produtos tem trazido como consequências: 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 (Dekker & Georgopoulos 1982; Ghini & Kimati 2002; Azevedo 2003).

Paralelamente, a pesquisa de novas substâncias ativas tem se mostrado cada vez mais um processo lento e caro para as empresas. Baseado no princípio da aleatoriedade, a quantidade de compostos orgânicos sintetizados em relação à de compostos introduzidos no mercado vem diminuindo enquanto que o tempo desse processo vem crescendo sensivelmente ano após ano. Nos anos 60, era necessário sintetizar 4.000 compostos para que um chegasse ao mercado, num prazo de avaliação de 4 a 5 anos. No início da década de 90, esta proporção era de um produto comercial para 20.000 sintetizados para um período de 8 a 10 anos de pesquisa. Isto significa que o retorno do capital investido pelas empresas é cada vez mais demorado do que foi no passado (Azevedo 2003).

1.3. POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS NO CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS

A demanda por formas alternativas de controle de doenças surgiu a partir do fortalecimento de movimentos contrários à chamada “Revolução Verde”, pacote tecnológico que se propunha a resolver o problema da fome e que atingiu o seu apogeu na década de 70. Agricultura orgânica, agricultura biodinâmica, agricultura biológica, agricultura natural e ainda, agricultura ecológica, permancultura, além de outras, desenvolveram-se, culminando com o conceito de agricultura sustentável, em resposta à delapidação das florestas tropicais, chuvas ácidas, destruição da camada de ozônio, efeito estufa e outras agressões ao meio ambiente freqüentemente associadas à agricultura convencional (Ehlers 1997).

Mesmo nestes sistemas de cultivo, considerados eco-compátíveis, problemas com pragas e doenças podem ocorrer causados por desequilíbrios temporários, havendo necessidade de controle.

Nestes sistemas, as intervenções são realizadas com produtos de baixa toxicidade e de baixo risco ao ambiente através dos chamados defensivos alternativos e naturais (Bettiol 1997; Penteado 2001). São considerados como defensivos alternativos todos os produtos químicos, biológicos, orgânicos ou naturais que possuam as seguintes características: praticamente não tóxicos (Classe Toxicológica IV), baixa ou nenhuma agressividade ao homem e à natureza, eficientes no combate aos insetos e microorganismos nocivos, custo reduzido para aquisição e emprego, simplicidade quanto ao manejo e aplicação e alta disponibilidade para aquisição (Penteado 2001).

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: a) o atendimento à crescente demanda por produtos que controlem doenças em culturas não contempladas pela agricultura convencional, b) a substituição dos fungicidas muito tóxicos por fungicidas com baixa toxidez, c) o desenvolvimento de uma opção viável de controle de doenças fúngicas em cultivos orgânicos e ao mesmo tempo, d) o desenvolvimento de um método eficaz a ser utilizado em estratégias anti-resistência dentro do manejo integrado de doenças.

Muitos metabólitos secundários encontrados nas plantas possuem funções de defesa contra herbívoros, pragas e patógenos (Bennett & Wallsgrove 1994). Segundo Harbone (1994), a diversidade bioquímica das plantas é tão rica quanto a dos animais. Diversas moléculas complexas pertencentes à classe dos terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos são sintetizados pelo chamado metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. O mesmo autor destaca que a riqueza de seu metabolismo se explica pelo fato de que as plantas estão enraizadas no solo onde vivem, não podendo reagir como os animais às adversidades do ambiente.

Diversos trabalhos têm sido realizados visando comprovar que metabólitos secundários apresentam ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e germinação de conídios, além de confirmar a eficácia de sua utilização, tanto em pulverizações visando o controle de doenças em partes aéreas, como em tratamentos de solos e de sementes.

Bonaldo *et al.* (2004), obtiveram inibição total na germinação de esporos e formação de apressórios de *Colletotrichum lagenarium* em concentrações de 20 e 1 % do extrato aquoso autoclavado de *Eucalyptus citriodora*, respectivamente. Lembrando que o apressório é uma estrutura necessária para a penetração do patógeno no hospedeiro, de tal forma que a sua ausência implica em redução da porcentagem de infecção. Verificaram também que os extratos aquosos autoclavados ou não autoclavados de *E. citriodora* induziram a síntese de fitoalexinas em sorgo a partir da concentração de 1 % e em soja a partir de 10 % e 15 % dos extratos aquosos autoclavados e não autoclavados, respectivamente, subentendendo uma ativação do seu mecanismo de defesa.

Miguel *et al.* (2006) verificaram redução significativa do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. isolados de fruto de morangueiro, através da utilização de óleo de neem (*Azadirachta indica*) misturado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) nas concentrações de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 %.

Pinto *et al.* (1998), utilizando extratos cetônicos de *Crotalaria paulina*, *Eucalyptus citriodora* e *Brassica oleracea* var. *capitata* na concentração de 1000 e 10.000 ppm inibiram completamente o crescimento micelial e a germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca do alho, apresentando sempre potencial fungicida superior ao extrato aquoso das mesmas plantas.

Valarini *et al.* (1994) utilizando extrato bruto em pó de folhas secas de *Cymbopogum citratus* no controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro, em condições de campo, observou que o extrato afetou a emergência das sementes com o pó de folhas secas proporcionando aumento de 96,7 % contra 75,0 e 86,7 % nos solos infestados por *R. solani* e *F. solani* f. sp. *phaseoli*, respectivamente.

Já existem relatos na literatura sobre a ação de óleos essenciais ou extratos de alho, arruda e mamona sobre fungos fitopatogênicos. Bolkan *et al.* (1981), verificou a toxicidade de extrato de alho sobre *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*. O extrato de alho foi tóxico também para

Curvularia spp., *Alternaria* spp. (Barros *et al.* 1995) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Ribeiro & Bedendo 1999).

Chalfoun & Carvalho (1987) estudando o efeito do extrato e do óleo industrial de alho diluído em meio de cultura BDA (batata+dextrose+agar), obteve inibição total do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Giberella zeae*, *Alternaria zinniae* e *Macrophomina phaseolina* para o extrato de alho (obtido por prensagem e filtração) e crescimento de 0,3, 0,0 e 0,0 para os patógenos, respectivamente, quando foi utilizado o óleo industrial.

Marcano *et al.* (2005) verificaram superioridade do extrato aquoso de *A. sativum* sobre o de *R. communis* na inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* e *Thielaviopsis basicola* em meio BDA, embora ambos tenham diferido significativamente da testemunha.

Bernardo *et al.* (1998), estudando a ação de óleo essencial de arruda nas alíquotas de 20, 40, 100, 500 e 1000 µL, verificaram inibição total do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp. e *Alternaria alternata* já a partir da alíquota de 20 µL.

Rosa *et al.* (2003), avaliando a atividade antimicrobiana de basidiomicetos brasileiros, demonstraram o potencial de aplicação de diversas espécies de basidiomicetos, notadamente *Irpex lacteus* CCB196, *Oudemansiella canarii* CCB179 e *Agrocybe perfecta* CCB161.

Segundo Azevedo (2003), plantas e fungos representam uma fonte alternativa quase inesgotável de novas estruturas químicas. A descoberta das estrobilurinas, 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 & Knight, 1994). Tais substâncias são produzidas por várias espécies de basidiomicetos decompositores de madeira notadamente *Oudemansiella mucida* (Schrad ex Fr) Hoehn e *Strobilurus tenacellus* (Pers ex Fr) Singer (Barlett *et al.* 2002). O programa

de desenvolvimento da Syngenta selecionou entre 1400 compostos sintetizados o fungicida azoxystrobin e o programa da BASF, o kresoxim-methyl (Barlett *et al.* 2002).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1 – Avaliar o potencial de extratos de plantas exóticas comerciais na inibição do crescimento micelial de *A. solani*, *C. acutatum* e *S. rolfsii*, da germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e da germinação de escleródios de *S. rolfsii*;
- 2 – Avaliar o potencial de extratos de plantas nativas de mata atlântica e de fungos basidiomicetos nativos na inibição do crescimento micelial de *A. solani*, *C. acutatum* e *S. rolfsii*, da germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e da germinação de escleródios de *S. rolfsii*

**Ação “*in vitro*” de extratos vegetais sobre *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout,
Colletotrichum acutatum Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

Ricardo José Domingues¹, Joana D.F. de Souza¹, Jesus G. Töfoli¹, Dácio R. Matheus¹

RESUMO - (Ação “*in vitro*” de extratos vegetais sobre *Alternaria solani* (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc.). A utilização de fungicidas é, em muitos casos, a única medida eficiente e viável de controlar doenças e garantir a sustentabilidade da atividade agrícola. Por outro lado, é também uma tecnologia que traz impactos negativos ao ambiente e à saúde pública. Os fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum* causam graves prejuízos às culturas de tomate e morango, respectivamente. *Sclerotium rolfsii* é considerado como patógeno polífago, capaz de provocar danos severos a diversas espécies agrícolas de importância econômica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação de extratos etanólicos e hexânicos de oito espécies vegetais sobre a: a) inibição de crescimento micelial desses fitopatógenos, b) inibição da germinação de conídios (*A. solani* e *C. acutatum*) e c) inibição da germinação de escleródios de *S. rolfsii*. Os extratos hexânicos de *Ruta graveolens*, *Allamanda cathartica*, *Impatiens walleriana*, *Allium sativum* e *Lavandula angustifolia* foram os que proporcionaram os menores valores de crescimento micelial dos três patógenos. O extrato hexânico de *A. sativum* foi o único a inibir totalmente a germinação de conídios de *A. solani*. Os extratos hexânicos de *I. walleriana*, *A. sativum* e *L. angustifolia* foram os únicos em que verificou-se ausência total de germinação de conídios de *C. acutatum*. Os extratos hexânicos de *R. graveolens* e de *I. walleriana* inibiram totalmente a germinação de escleródios de *S. rolfsii*.

Palavras-chave: fungicida, controle alternativo, antracnose, pinta preta, podridão de *Sclerotium*

¹APTA / Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252. CEP.: 04014-002, São Paulo, SP, Brasil

²Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia, São Paulo, SP, Brasil

ABSTRACT – (“*In vitro*” action of plants extracts on *Alternaria solani* (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds and *Sclerotium rolfsii* Sacc.). The use of fungicides is, in many cases, the only efficient and viable measure of to control diseases and to guarantee the sustainability of the agricultural activity. On the other hand, it is also a technology that brings negative impacts to the environment and the public health. The fungi *Anternaria solani* and *Colletotrichum acutatum* cause serious damages to the tomato and strawberry crops, respectively. *Sclerotium rolfsii* is a soil pathogen, capable to provoke hard damages to several agricultural species. The present work had as objective evaluates the action of ethanolics and hexanics extracts of eight vegetable species on the: the) inhibition of mycelial growth of those phytopathogens, b) inhibition of the conidial germination (*A. solani* and *C. acutatum*) and c) inhibition of the sclerotial germination of *S. rolfsii*. The hexanics extracts of *Ruta graveolens*, *Allamanda cathartica*, *Impatiens walleriana*, *Allium sativum* and *Lavandula angustifolia* were the ones that provided the smallest values of mycelial growth of the three pathogens. The hexanic extract of *A. sativum* was the only to inhibit the conidial germination of *A. solani*. The hexanics extracts of *I. walleriana*, *A. sativum* and *L. angustifolia* were the only ones in that total absence of conidial germination of *C. acutatum*. The hexanics extracts of *R. graveolens* and *I. walleriana* totally inhibited the sclerotial germination of *S. rolfsii*.

Key words: fungicide, alternative control, anthracnose, early blight, Sclerotium root rot

Introdução

Alternaria solani (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc. são fungos fitopatogênicos capazes de provocar danos severos a várias espécies agrícolas de importância econômica.

A. solani, agente causal da doença conhecida como “pinta preta” está entre os principais patógenos em folhas, hastes e frutos do tomateiro (Duarte & Albuquerque 1971; Tello Marquina & De La Vega 1995). A alta severidade da “pinta preta” é caracterizada por intensa redução da área foliar e vigor das plantas, quebra de hastes, queda e depreciação de frutos, bem como, a morte de plantas (Vale *et al.* 2000; Kurozawa & Pavan 2005). Afeta a produtividade e qualidade de frutos, ocasionando, via de regra, perdas elevadas quando medidas de controle não são conduzidas de forma adequada (Lopes & Ávila 2005; Jones *et al.* 1993). Estudo realizado por Basu (1974) demonstrou que a doença, sem a aplicação de fungicidas, pode atingir até 60% da área foliar causando reduções de 10% no tamanho dos frutos e 10 a 30% no número de frutos comerciais.

A antracnose ou flor preta é considerada a principal doença da cultura do morangueiro (Passos 1999), podendo causar perdas que variam entre 30 e 68 % (Henz *et al.* 1992). A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, embora *C. fragariae* possa, em pequena escala, produzir sintomas em flores (Tanaka & Passos 1998). *C. acutatum* pode infectar, além das flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e parte superior do rizoma e é de difícil controle, podendo ser limitante quando as condições climáticas forem favoráveis (Tanaka *et al.* 2005).

S. rolfsii é um fungo que faz parte da microflora do solo (habitante do solo) e é considerado como um patógeno causador de podridão de raiz e colo, podendo atacar plantas em todos os seus estádios de desenvolvimento. Os danos provocados às raízes comprometem a absorção de água e nutrientes, prejudicando o desenvolvimento das plantas. As plantas mais jovens normalmente são mais sensíveis, podendo morrer rapidamente, enquanto as mais velhas

demoram mais ou até mesmo nem chegam a morrer, mas tem a sua produtividade reduzida (Bedendo 1995). O micélio dá origem aos escleródios, inicialmente pequenos, de cor branca que, durante o seu desenvolvimento, escurecem podendo ser esféricos ou de formato irregular, responsáveis pela sobrevivência a condições adversas e disseminação do fungo (Bedendo 1995; Agrios 1997).

Ao mesmo tempo em que representa uma solução eficiente e econômica para a agricultura (Kimati 1995), o controle químico de doenças é também considerado uma prática que traz impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública (Bettiol 1997) como: geração de produtos de degradação ou metabólitos, persistência de produtos no meio ambiente (meia vida), resíduos acima dos limites de tolerância em alimentos (Azevedo 2003; Zambolim *et al.* 2000), além de intoxicação de agricultores, eliminação dos microrganismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica e por controle biológico (Schwan-Estrada *et al.* 2003).

Os estudos realizados com extratos vegetais visando o controle de fitopatógenos tem comprovado que tais produtos podem representar uma fonte inesgotável de substâncias com potencial fungicida (Azevedo 2003). Segundo Harbone (1994), isso se justifica pelo fato da diversidade bioquímica das plantas ser tão rica quanto a dos animais. Diversas moléculas complexas como terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos são sintetizados pelo chamado metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. O mesmo autor destaca que a riqueza de seu metabolismo se explica pelo fato de que as plantas estão enraizadas no solo onde vivem, não podendo reagir como os animais às adversidades do ambiente.

A ação antifúngica de extratos de plantas ou óleos essenciais contra fitopatógenos já foi relatada por vários autores. Estudos comprovaram o potencial fungicida dos extratos de alho (*Allium sativum*) (Chalfoun & Carvalho 1987; Ribeiro & Bedendo 1999), de arruda (*Ruta graveolens*) (Bonaldo *et al.* 2004; Pinto *et al.* 1998; Valarini *et al.* 1994) e de mamona (*Ricinus communis*) (Marcano *et al.* 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito de extratos etanólicos e hexânicos de plantas exóticas comerciais sobre o crescimento micelial dos três fungos fitopatogênicos já citados, na germinação de conídios de *C. acutatum* e de *A. solani* e na germinação de escleródios de *S. rolfsii*.

Material e métodos

Isolamento e produção de inóculo dos fungos fitopatogênicos

Os três patógenos foram obtidos a partir de amostras apresentando sintomas das doenças coletadas em plantios comerciais no município de Piedade, SP, e mantidos em tubo inclinado com meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar), a 24°C na micoteca do Centro de P&D de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico. *C. acutatum* foi isolado a partir de flores de morangueiro, *A. solani* de folhas de tomateiro e *S. rolfsii* de raízes de beterraba.

A produção de conídios de *C. acutatum* e de escleródios de *S. rolfsii* foi feita a partir da repicagem dos fungos para placas de Petri (de 9 cm de diâmetro) contendo meio de BDA (batata+dextrose+agar) que foram, a seguir, mantidos em BOD a 24 °C e luz contínua durante sete dias. A indução de esporulação de *A. solani* foi feita segundo Töfoli & Kurozawa (1993).

Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos hexânicos e etanólicos foram utilizadas folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* (hibisco), *Allamanda cathartica* (alamanda), *Coffea arabica* (café), *Ruta graveolens* (arruda), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Ricinus communis* (mamona), *Impatiens walleriana* (maria-sem-vergonha) e bulbilhos de *Allium sativum* (alho). O material vegetal foi coletado nas dependências do Instituto Biológico, município de São Paulo, enquanto que os bulbilhos de alho foram adquiridos no comércio do mesmo município. O material vegetal foi

seco em estufa a 40 °C e em seguida moído. O pó resultante foi submetido à extração com hexano, à temperatura ambiente, por três dias. O solvente foi filtrado e evaporado em um evaporador à pressão reduzida. Após a extração com hexano, foi realizada a extração com etanol utilizando-se o mesmo procedimento. Os resíduos hexânicos e etanólicos foram depositados na extratoteca do Laboratório de Fungicidas e Fitoprotetores, do Instituto Biológico/SAA-SP e utilizados para os testes.

Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos

Um experimento preliminar foi realizado com todos os extratos em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) que foi preparado e autoclavado por 30 min. a 120 °C. Cada um dos extratos foi adicionado ao BDA fundente nas concentrações de 0 e 1000 µg.mL⁻¹ e vertido em placas de Petri (5 cm de Ø). Discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos, foram transferidos para o centro das placas que foram em seguida incubadas 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 em duas retas perpendiculares traçadas no fundo de cada placa.

Os cinco extratos que promoveram maior inibição do crescimento foram avaliados em experimentos subsequentes nas concentrações 0, 1, 10, 100, 1000 e até 10000 µg.mL⁻¹, empregando-se a mesma metodologia agora incubando-os em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Efeito de extratos vegetais sobre a germinação de conídios de *C. acutatum* e *A. solani*.

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly (1978). Dez discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre três discos de papel de filtro embebidos em solução de extratos nas concentrações 0 e 1000 µg.mL⁻¹, em triplicata. Posteriormente, uma gota de

suspensão de conídios de *A. solani*, e *C. acutatum*, na concentração de 10^4 conídios/mL foi depositada sobre cada disco de celofane. As placas assim preparadas foram mantidas sob fotoperíodo de 12 h e 25°C.

A avaliação de germinação dos conídios foi feita transferindo-se os discos de celofane para uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma pinça, sobre a qual foram colocadas uma gota de água e uma lamínula. A observação foi feita em microscópio óptico após 16 h de incubação considerando-se como germinados os conídios que já apresentassem tubo germinativo ou em início de formação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo que cada parcela consistiu de uma placa de Petri com 10 discos de celofane.

Efeito de extratos vegetais sobre a germinação de escleródios de *S. rolfii*.

Dez escleródios de *S. rolfii* foram transferidos para placas de Petri (5 cm Ø) contendo meio de cultura BDA e cada um dos extratos, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial já descrito, e incubadas por 48 h a 24°C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada parcela sendo composta por 10 placas de cada extrato contendo 10 escleródios cada uma. A avaliação foi feita contando-se a porcentagem de escleródios germinados.

Resultados e discussão

Os resultados do ensaio de crescimento micelial com todos os extratos para os fitopatógenos estão apresentados na Tab. 1. Em geral, os melhores resultados foram obtidos com os extratos hexânicos em relação aos etanólicos. Os extratos hexânicos de *R. graveolens*, *A. cathartica*, *I. walleriana*, *A. sativum* e *L. angustifolia* foram os que proporcionaram os menores valores de crescimento. Inibição total do crescimento micelial foi obtido com esses extratos para

182 *S. rolfsii* e com *I. walleriana* para *A. solani*. Nenhum extrato conseguiu inibir totalmente o
183 crescimento de *C. acutatum*.

184 Quando foram comparados apenas a ação dos melhores extratos sobre o crescimento
185 micelial de *S. rolfsii* (Tab. 2), apenas *R. graveolens* e *I. walleriana* conseguiram inibir totalmente
186 o crescimento do fungo a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. *R. graveolens* foi o que mais se destacou na
187 concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, proporcionou resultado semelhante a *I. walleriana*,
188 sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Nenhum dos extratos inibiu
189 significativamente o crescimento micelial de *S. rolfsii* na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

190 Com relação a *C. acutatum* (Tab. 3), verificou-se inibição total do crescimento micelial
191 para os cinco melhores extratos quando testados na concentração de $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A 1000
192 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *R. graveolens* foi o extrato no qual o patógeno cresceu menos. *R. graveolens* não
193 diferiu estatisticamente de *I. walleriana* e *A. sativum* na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e apenas
194 de *A. sativum* a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

195 Para *A. solani* (Tab. 4), os cinco extratos selecionados inibiram totalmente o seu
196 crescimento micelial na concentração de $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. *R. graveolens* não diferiu
197 estatisticamente de *A. cathartica* e de *A. sativum* a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, *A. sativum* foi
198 superior a *R. graveolens* e *I. walleriana*, sendo semelhante a *A. cathartica* e *L. angustifolia*. O
199 patógeno não foi inibido por nenhum extrato na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

200 Em relação à germinação de escleródios de *S. rolfsii* e de conídios de *A. solani* e de *C.*
201 *acutatum* (Tab. 5), verificou-se a mesma tendência de superioridade dos extratos hexânicos sobre
202 os etanólicos, com exceção de *R. communis* e de *L. angustifolia*, cujos extratos etanólicos
203 proporcionaram menores porcentagens de germinação que os hexânicos.

204 O extrato hexânico de *A. sativum* foi o único a inibir totalmente a germinação de conídios
205 de *A. solani*. Os extratos de *R. communis* (etanólico), *L. angustifolia* (etanólico e hexânico) e *I.*
206 *walleriana* (hexânico) reduziram a germinação de conídios quando comparados à testemunha.

207 Em relação a *C. acutatum*, enquanto alguns extratos reduziram, outros foram indiferentes
208 ou até mesmo induziram a germinação de conídios quando comparados com os valores obtidos
209 na testemunha. Os extratos hexânicos de *I. walleriana*, *A. sativum* e *L. angustifolia* foram os
210 únicos em que se verificou ausência total de germinação. Para os extratos de *C. arábica*
211 (etanólico), *R. graveolens* (hexânico) e *A. cathartica* (hexânico), verificou-se níveis de
212 germinação inferiores aos verificados na testemunha. Os extratos de *R. communis* (hexânico e
213 etanólico), *C. arábica* (hexânico), *R. graveolens* (etanólico), *H. rosa-sinensis* (etanólico) e *I.*
214 *walleriana* (etanólico) induziram a germinação de conídios enquanto *A. cathartica* (etanólico), *H.*
215 *rosa-sinensis* (hexânico), *A. sativum* (etanólico) e *L. angustifolia* (etanólico) foram semelhantes à
216 testemunha.

217 Os extratos hexânicos de *R. graveolens* e de *I. walleriana* inibiram totalmente a
218 germinação de escleródios de *S. rolfii*, sendo semelhantes ao extrato hexânico de *A. sativum*. Os
219 extratos hexânicos de *H. rosa-sinensis* e de *L. angustifolia* permitiram a germinação de 31 e 80
220 % dos escleródios, respectivamente.

221 A ação de óleos essenciais ou extratos de alho, arruda e mamona sobre fitopatógenos já foi
222 relatada na literatura. Bolkan *et al.* (1981), verificou a toxicidade de extrato de alho sobre
223 *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*. O extrato de óleo foi tóxico para *Curvularia* spp.,
224 *Alternaria* spp. (Barros *et al.* 1995) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Ribeiro & Bedendo 1999).
225 Chalfoun & Carvalho (1987) estudando o efeito do extrato e do óleo industrial de alho diluído
226 em meio de cultura BDA (batata+dextrose+agar), obteve inibição total do crescimento micelial
227 dos fungos fitopatogênicos *Giberella zeae*, *Alternaria zinniae* e *Macrophomina phaseolina* para
228 o extrato de alho (obtido por prensagem e filtração) e crescimento de 0,3, 0,0 e 0,0 para os
229 patógenos, respectivamente, quando foi utilizado o óleo industrial, ambos na concentração de
230 6000 ppm. Marcano *et al.* (2005) verificaram superioridade do extrato aquoso de *A. sativum*
231 sobre o de *R. communis* na inibição do crescimento micelial de *S. rolfii* e *Thielaviopsis basicola*
232 em meio BDA, embora ambos tenham diferido significativamente da testemunha. Para o extrato

de alho, verificou total inibição do crescimento na concentração de 5 g.L⁻¹ de extrato. Bernardo *et al.* (1998), estudando a ação de óleo essencial de arruda nas alíquotas de 20, 40, 100, 500 e 1000 µL, verificaram inibição total do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp. e *Alternaria alternata* já a partir da alíquota de 20 µL.

Em geral os extratos hexânicos mostraram maior atividade antifúngica em relação aos seus correspondentes etanólicos. Sabe-se que os extratos brutos na verdade são constituídos não de uma, mas de diversas substâncias que juntas podem ser as responsáveis pela ação fungitóxica. Provavelmente, essas substâncias produzidas pelas espécies vegetais estudadas, foram melhor extraídas pelo hexano (solvente apolar) do que pelo etanol (solvente polar). Segundo Trombeta *et al* (2005), acredita-se, que os óleos constituídos de monoterpenos, possuam esta atividade por desencadearem efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos microorganismos, como por exemplo, alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações estas, explicadas principalmente pelo caráter lipofílico destas substâncias.

O efeito da indução da germinação de conídios de *C. acutatum* foi verificado por Bonaldo & Pascholati (2007) em *C. sublineolum* e *C. lagenarium* e pode ser explicado pela presença de substâncias estimuladoras nos extratos, pela disponibilização de nutrientes ou pela inativação da micosporina-alanina, um auto inibidor de germinação já encontrado na mucilagem que envolve os conídios de outras espécies do gênero *Colletotrichum*.

Em geral, os trabalhos que estudam atividade antimicrobiana de extratos são feitos empregando-se espécies conhecidas como plantas medicinais, apresentando grande quantidade de relatos que comprovam sua eficácia na medicina humana. No presente trabalho foram utilizadas espécies que possuem pouca ou nenhuma utilização desse tipo, exceto para *A. sativum*, *R. communis* e *R. graveolens*. Tal fato mostra quão amplo pode ser este campo de pesquisa e quanto ainda existe por ser feito. Diversas espécies vegetais podem apresentar potencial como fontes alternativas de substâncias com ação fungicida e o seu estudo poderá contribuir para a

redução dos problemas hoje existentes no controle químico de doenças fúngicas na agricultura. É evidente que, outros estudos devem ser realizados visando avaliar também, o potencial toxicológico dessas substâncias ao homem e ao ambiente antes de serem empregadas em larga escala.

Referências bibliográficas

- Agrios, G. N. 1997. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press. 635p.
- Azevedo, L.A. S. 2003. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. 320p. Campinas: EMOPI Editora e Gráfica.
- Barros, S.T.; Oliveira, N.T. & Maia, L.C. 1995. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. **Summa Phytopathologica** 21(2): 168-170.
- Basu, P. K. 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. **Canadian Plant Diseases** 54: 45-51.
- Bedendo, I. P. 1995. Grupos de Doenças. Pp.805-907. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres.
- Bernardo, R.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Cruz, M. E. S. & Pascholati, S. F. 1998. Fungitoxicidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, 23: 227.
- Bettiol, W. 1997. Alguns produtos alternativos para o controle de doenças de plantas em agricultura orgânica. Pp.52-63. In: **Anais do 2º Ciclo de Palestras sobre Agricultura Orgânica**. São Paulo.

- 284 Bolkan, H.A. & Ribeiro, W.R.C. 1981. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*,
285 *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira** 6(1):
286 565-566.
- 287 Bonaldo, S. M.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Tessmann, D. J. & Scapim, C. A.
288 2004. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra
289 *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia**
290 **Brasileira** 29(2) 128-134.
- 291 Bonaldo, S.M. & Pascholati, S.F. 2007. Efeito de frações purificadas de *Saccharomyces*
292 *cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum*
293 *sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica** 33(3): 233-238.
- 294 Chalfoun, S.M. & Carvalho, V.D. 1987. Efeito do extrato e de óleo industrial sobre o
295 desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira** 12(3): 234-235.
- 296 Duarte, M.L.R. & Albuquerque, F.C. 1971. Tomato disease in the Amazon region. **Fitotecnia**
297 **292**: 9-34.
- 298 Harbone, J.B. 1994. **The plant and its biochemical adaptation to the environment**. New
299 York, Academic Press, 384p.
- 300 Henz, G. P.; Boiteux, L. S. & Lopes, C. A. 1992. Outbreak of strawberry anthracnose caused by
301 *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. **Plant Disease** 76(2): 212.
- 302 Jones, J. B.; Stall, R. E. & Zitter, T. A. 1993. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul,
303 American Phytopathological Society, 73p.
- 304 Kimati, H. 1995. Controle Químico. Pp. 761-785. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H; Amorin, L.
305 (Eds.) **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos (1)**. São Paulo: Agronômica
306 Ceres.
- 307 Kurozawa, C. & Pavan, M. 2005. Doenças do Tomateiro. Pp. 607-626. In: H. Kimati, L. Amorin,
308 A. M. Resende, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de**
309 **Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas (2)**. São Paulo: Agronômica Ceres.

- 310 Lopes, C.A. & Ávila, A. C. 2005. **Doenças do tomateiro**. 151p. Brasília: Embrapa Hortaliças.
- 311 Marcano, D.A.; Vargas, N. & Pire, A. 2005. Efecto de extratos vegetales y fungicidas sintéticos
312 sobre el crecimiento in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Caracas, **Revista**
313 **de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia** 22(4): 315-323.
- 314 Nelly, D. 1978. **Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides,**
315 **nematicides and bactericides**. 140 p. Minnessota: American Phytopathological Society.
- 316 Passos, F. A. 1999. Melhoramento do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas.
317 Pp.259-264. In: J. Duarte Filho, G. M. A. Cançado, M. A. Regina, L. E. C. Antunes, M. A.
318 M. Fadini, (Eds.) **Morango: Tecnologia de produção e processamento**. Caldas: EPAMIG.
- 319 Pinto, C. M. F.; Maffia, L. A.; Casali, V. W. D. & Cardoso, A. A. 1998. In vitro effect of plant
320 leaf extracts on micelial growth and sclerotium germination of *Sclerotium cepivorum*.
321 **Journal of Phytopathology** 145(8-9): 421-425.
- 322 Ribeiro, L. F. & Bedendo, I. P. 1999. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum*
323 *gloeosporioides* agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola** 56(4):
324 1267-1271.
- 325 Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R. & Cruz, M. E. S. 2003. Uso de plantas medicinais no
326 controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira** 28: 54-56.
- 327 Tanaka, M. A. S. & Passos, F. A. 1998. Caracterização cultural e morfológica de isolados de
328 *Colletotrichum* causadores de antracnose do morangueiro em São Paulo. **Summa**
329 **Phytopathologica** 24(2): 145-151.
- 330 Tanaka, M. A. S.; Betti, J. A. & Kimati, H. 2005. Doenças do morangueiro-*Fragaria x ananassa*
331 Duch. Pp.489-499. In: H. Kimati, L. Amorin, L., J. A. Rezende, A. Bergamin Filho, L. E. A.
332 Camargo (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo,
333 Agronômica Ceres.
- 334 Tello Marquina, J. C. & Vega, J. D. M. 1995. Enfermedades no víricas del tomate. Pp.523-563.
335 In: F. Nuez (Coord). **El cultivo del tomate**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

- 336 Töfoli, J. G. & Kurozawa, C. 1993. Efeito de três meios de cultura e duas temperaturas na
337 produção de conídios de *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica** **19**: 41.
- 338 Trombeta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Sija, A.;
339 Mazzanti, G. & Bisignanano, G. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three
340 Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **49**(6): 2474-2478.
- 341 Valarini, J. P.; Friguetto, R. T. S. & Melo, I. S. 1994. Potencial da erva medicinal *Cymbopogum*
342 *citratum* (capim-limão) no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura** **69**:
343 139-150.
- 344 Vale, F. X. R.; Zambolim, L.; Paul, P. A. & Costa, H. 2000. Doenças causadas por fungos em
345 tomate. Pp.699-755. In : L. Zambolim, F. X. R. Vale, H. Costa (Eds) **Controle de doenças**
346 **de plantas – Hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 347 Zambolim, L.; Costa, H. & Vale, F. X. R. 2000. Situação atual do controle químico de doenças
348 de hortaliças. **Horticultura Brasileira** **18**: 96-110.
- 349
- 350
- 351
- 352
- 353
- 354

355 Tabela 1 – Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) e porcentagem de inibição em relação à testemunha de *Sclerotium. rolfii*, *Colletotrichum*
 356 *acutatum* e *Alternaria solani* em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+extratos vegetais na concentração de 1000 µg.mL⁻¹.

Espécie Botânica	Tipo	<i>S. rolfii</i>			<i>C. acutatum</i>			<i>A. solani</i>		
		Diâmetro (cm)	Inibição (%)		Diâmetro (cm)	Inibição (%)		Diâmetro (cm)	Inibição (%)	
<i>Ricinus communis</i>	hexânico	5,0	e ¹	0,0	3,7	defg	26,0	3,3	e	34,0
<i>Ricinus communis</i>	etanólico	5,0	e	0,0	4,0	efgh	20,0	5,0	g	0,0
<i>Coffea arabica</i>	hexânico	5,0	e	0,0	3,5	def	30,0	4,3	f	14,0
<i>Coffea arabica</i>	etanólico	5,0	e	0,0	3,8	defg	24,0	5,0	g	0,0
<i>Ruta graveolens</i>	hexânico	0,0	a	100,0	2,1	abc	58,0	2,0	c	60,0
<i>Ruta graveolens</i>	etanólico	5,0	e	0,0	3,2	def	36,0	3,4	e	32,0
<i>Allamanda cathartica</i>	hexânico	0,0	a	100,0	2,1	ab	58,0	2,2	c	56,0
<i>Allamanda cathartica</i>	etanólico	5,0	e	0,0	3,8	efg	24,0	2,9	d	42,0
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	hexânico	5,0	e	0,0	3,8	efg	24,0	4,4	f	12,0
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	etanólico	5,0	e	0,0	3,2	cde	36,0	5,0	g	0,0
<i>Impatiens walleriana</i>	hexânico	0,0	a	100,0	2,7	bcd	46,0	0,0	a	100,0
<i>Impatiens walleriana</i>	etanólico	2,1	bcd	58,0	3,9	efg	22,0	4,9	g	2,0
<i>Allium sativum</i>	hexânico	1,8	bc	64,0	1,1	a	78,0	1,2	b	76,0
<i>Allium sativum</i>	etanólico	2,5	cd	50,0	4,3	fgh	14,0	4,7	fg	6,0
<i>Lavandula angustifolia</i>	hexânico	1,0	a	80,0	1,5	a	70,0	1,1	b	78,0
<i>Lavandula angustifolia</i>	etanólico	3,2	d	36,0	4,6	gh	8,0	5,0	g	0,0
Testemunha	–	5,0	e	0,0	5,0	h	0,0	5,0	g	0,0
CV (%)		12,13295			10,89647			3,91045		

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

358

359 Tabela 2 – Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Sclerotium rolfsii* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de
 360 cultura BDA + extratos vegetais hexânicos nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg.mL⁻¹.

Espécie Botânica	Concentrações dos extratos			
	1 µg.mL ⁻¹	10 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
<i>Ruta graveolens</i>	9,0	4,6 d	2,5 d	0,0 d
<i>Allamanda cathartica</i>	9,0	8,3 ab	5,4 b	2,3 bc
<i>Impatiens walleriana</i>	9,0	4,6 d	3,8 c	0,0 d
<i>Allium sativum</i>	9,0	7,3 b	5,5 b	2,7 b
<i>Lavandula angustifolia</i>	9,0	5,9 c	3,8 c	1,8 c
Testemunha	9,0	9,0 a	9,0 a	9,0 a
CV (%)	—	6,70054	4,86543	9,32153

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

362

363

364

365

366

367

368

369 Tabela 3 – Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio
 370 de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos nas concentrações de 0, 10, 100, 1000 e 10000 µg.mL⁻¹.

Espécie Botânica	Concentrações dos extratos			
	10 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹	10000 µg.mL ⁻¹
<i>Ruta graveolens</i>	8,3 b	6,5 c	4,0 d	0,0
<i>Allamanda cathartica</i>	9,0 a	7,9 b	5,0 c	0,0
<i>Impatiens walleriana</i>	9,0 a	7,0 bc	6,3 b	0,0
<i>Allium sativum</i>	8,2 b	7,1 bc	5,7 bc	0,0
<i>Lavandula angustifolia</i>	9,0 a	7,7 b	5,9 b	0,0
Testemunha	9,0 a	9,0 a	9,0 a	9,0
CV (%)	1,82814	4,20936	4,94973	–

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

372

373

374

375

376

377

378

379

380 Tabela 4 – Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Alternaria solani* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de
 381 cultura BDA + extratos vegetais hexânicos nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10000 µg.mL⁻¹.

Espécie Botânica	Concentrações dos extratos			
	10 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹	10000 µg.mL ⁻¹
<i>Ruta graveolens</i>	9,0	7,0 b	3,2 c	0,0
<i>Allamanda cathartica</i>	9,0	5,8 bc	3,9 bc	0,0
<i>Impatiens walleriana</i>	9,0	6,8 b	4,8 b	0,0
<i>Allium sativum</i>	9,0	5,3 c	4,5 bc	0,0
<i>Lavandula angustifolia</i>	9,0	6,3 bc	4,7 b	0,0
Testemunha	9,0	9,0 a	9,0 a	9,0
CV (%)	–	6,98292	9,00081	–

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

383

384

385

386

387

388

389

390

391 Tabela 5 – Porcentagem de germinação de conídios de *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum* e de escleródios de *Sclerotium rolfsii* pelos
 392 extratos vegetais na concentração de 1000 µg.mL⁻¹.

Espécie Botânica	Tipo	<i>A. solani</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>S. rolfsii</i>
<i>Ricinus communis</i>	hexânico	87,6 ab	91,9 a	100,0 a
<i>Ricinus communis</i>	etanólico	25,7 d	71,7 b	100,0 a
<i>Coffea arabica</i>	hexânico	100,0 a	93,4 a	100,0 a
<i>Coffea arabica</i>	etanólico	100,0 a	18,7 gh	100,0 a
<i>Ruta graveolens</i>	hexânico	98,9 a	12,1 h	0,0 d
<i>Ruta graveolens</i>	etanólico	100,0 a	54,3 c	96,0 a
<i>Allamanda cathartica</i>	hexânico	93,6 ab	11,5 h	94,0 a
<i>Allamanda cathartica</i>	etanólico	100,0 a	21,1 fg	93,0 ab
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	hexânico	100,0 a	32,3 e	31,0 c
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	etanólico	100,0 a	41,3 d	100,0 a
<i>Impatiens walleriana</i>	hexânico	62,1 c	0,0 i	0,0 d
<i>Impatiens walleriana</i>	etanólico	100,0 a	54,8 c	100,0 a
<i>Allium sativum</i>	hexânico	0,0 e	0,0 i	6,0 d
<i>Allium sativum</i>	etanólico	100,0 a	25,4 efg	94,0 a
<i>Lavandula angustifolia</i>	hexânico	79,3 b	0,0 i	80,0 b
<i>Lavandula angustifolia</i>	etanólico	37,3 d	29,6 e	100,0 a
Testemunha	–	100,0 a	28,1 ef	100,0 a
CV (%)		5,88184	6,91547	12,29764

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

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS E DE
BASIDIOMICETOS NATIVOS SOBRE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*,
ALTERNARIA SOLANI E *SCLEROTIUM ROLFSII***

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

¹ APTA / Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade
Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252. CEP.: 04014-002, São Paulo, SP.
domingues@biologico.sp.gov.br; ² Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e
Bioquímica de Plantas, São Paulo, SP; ³ Instituto de Botânica, Seção de Micologia e
Liquenologia, São Paulo, SP.

RESUMO

Domingues, R.J.; Young, M.C. M.; Töfoli, J.G.; Matheus, D.R. Avaliação do potencial
antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum*
acutatum, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Summa Phytopathologica*,

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, tem
provocado danos tanto ao homem como ao ambiente na forma de geração de produtos
de degradação ou metabólitos, persistência no meio ambiente, resíduos acima dos

limites de tolerância em alimentos, intoxicação dos agricultores, eliminação dos microrganismos benéficos e seleção de fungos resistentes. O presente trabalho teve por objetivo o estudo “in vitro” da eficácia de extratos de três plantas e de dois basidiomicetos da flora brasileira no controle dos fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum acutatum*, causadores de graves prejuízos às culturas de tomate e morango, respectivamente, além de *Sclerotium rolfsii*, considerado como patógeno polífago, capaz de provocar danos severos a diversas espécies agrícolas de importância econômica. No trabalho foram avaliados: a) a inibição de crescimento micelial dos três fitopatógenos, b) inibição da germinação de conídios (*A. solani* e *C. acutatum*) e c) inibição da germinação de escleródios de *S. rolfsii*. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato do basidiomiceto *Oudemansiella canarii*, que proporcionou os menores valores de crescimento micelial dos três patógenos, além inibir totalmente a germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e de escleródios de *S. rolfsii*. O extrato de *Irpex lacteus* inibiu parcialmente o crescimento micelial dos patógenos estudados e o extrato de *Avicennia schaueriana* promoveu apenas 16 % de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii*. Nenhum efeito sobre os patógenos foi verificado com os extratos de *Senna spectabilis* e *Senna multijuga* nas condições em que foram realizados os experimentos.

Palavras-chave adicionais: *Irpex lacteus*, *Oudemansiella canarii*, produtos naturais.

ABSTRACT

Domingues, R.J.; Young, M.C.M.; Töfoli, J.G.; Matheus, D.R. Evaluation of antifungal potential of extracts of native plants and basidiomycetes on *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Summa Phytopathologica*,

The sustainability of a lot of crops of agricultural importance has been obtained thanks to the use of chemical products known as fungicides. The use of these products, mainly when used in an inadequate way, it has been provoking damages to the environment and humans health when originate degradation products or metabolites, persistence in the environment, residues above the tolerance limits in foods, the farmers intoxication, elimination of the beneficial microorganisms and selection of resistant pathogens. The present work aimed to investigate the effect "in vitro" of extracts of three plants and of two basidiomycetes of the Brazilian flora in the control of *Alternaria solani* and *Colletotrichum acutatum*, causes serious damages to the tomato and strawberry crops, respectively, and *Sclerotium rolfsii*, considered as non-especific pathogen, capable to provoke severe damages to several agricultural species of economical importance. This work evaluated: a) the inhibition of micelial growth of the three phytopathogens, b) inhibition of conidial germination (*A. solani* and *C. acutatum*) and c) inhibition of sclerotial germination of *S. rolfsii*. The best results were obtained with the extract of *Oudemansiella canarii*, that provided the smallest values of micelial growth of the three pathogens, beyond to inhibit totally the conidial germination of *A. solani* and *C. acutatum* and sclerotial germination of *S. rolfsii*. The *I. lacteus* extract inhibited the micelial growth of the pathogens partially. Any effect on the pathogens was verified with the *Senna spectabilis* and *Senna multijuga* extracts in the conditions in that the experiments were accomplished.

Additional keywords: *Irpex lacteus*, *Oudemansiella canarii*, natural products.

73 INTRODUÇÃO

74 O estudo da atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de extratos
75 vegetais e fúngicos pode contribuir tanto para o desenvolvimento de uma forma
76 potencial de controle alternativo, quando utilizado diretamente, como numa fonte de
77 substâncias que nas mãos de empresas químicas tornam-se produtos a serem utilizados
78 no controle de doenças fúngicas na agricultura. Sabe-se que muitos metabólitos
79 secundários encontrados nas plantas possuem funções de defesa contra herbívoros,
80 pragas e patógenos (7). Segundo Harbone (11), a diversidade bioquímica das plantas é
81 tão rica quanto a dos animais. Diversas moléculas complexas como terpenoides,
82 alcalóides e compostos fenólicos são sintetizados pelo chamado metabolismo
83 secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas
84 planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. Tais
85 substâncias são consideradas como produtos naturais e representam uma fonte
86 alternativa quase inesgotável de novas estruturas químicas (4).

87 A flora brasileira é considerada a mais rica do mundo com cerca de 56.000
88 espécies de plantas (9). No caso dos fungos as estimativas indicam existirem no Brasil
89 entre 12,5 e 13,5 mil espécies (20). Com exceção de espécies de importância medicinal,
90 muito pouco conhecemos a respeito da composição química de 99,6 % das espécies de
91 plantas da flora brasileira (17).

92 A descoberta das estrobilurinas, grupo de fungicidas desenvolvidos a partir de
93 compostos de origem natural (estrobilurina A e oudemansina A), trouxe para a
94 agricultura a opção de um produto com características altamente favoráveis como: perfil
95 agroecotoxicológico favorável, modo de ação distinto dos grupos já existentes e
96 espectro de ação sobre fungos pertencentes às subdivisões Ascomycotina,

Basidiomycotina e Deuteromycotina (13). Tais substâncias são produzidas por várias espécies de basidiomicetos decompositores de madeira notadamente *Strobilurus tenacellus* (Pers ex Fr) Singer (5) e *Oudemansiella mucida* (Schrad ex Fr) Hoehn, respectivamente.

Rosa et al. (22), avaliando a atividade antimicrobiana de basidiomicetos brasileiros, demonstraram o potencial de aplicação de algumas espécies, entre eles *Irpex lacteus* CCB196, *Oudemansiella canarii* CCB179 e *Agrocybe perfecta* CCB161, na inibição de quatro espécies de fungos do gênero *Cândida*, de grande importância na medicina humana.

Entre as plantas do gênero *Senna*, sabe-se que *S. spectabilis* produz alcalóides com potencial farmacológico já conhecido (21). No caso do gênero *Avicennia*, Tarik et. al. (26) demonstraram a ação nematicida de extratos aquosos e etanólicos de *A. marina* contra *Meloidoyne javanica*.

Alternaria solani (ELL. & Martin) Jones & Grout, *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *Sclerotium rolfsii* Sacc. são fungos fitopatogênicos capazes de provocar danos severos a espécies olerícolas de grande importância econômica. *A. solani*, agente causal da doença conhecida como “pinta preta” está entre os principais patógenos de folhas, hastes e frutos do tomateiro (27). A alta severidade da doença resulta em intensa redução da área foliar e vigor das plantas, quebra de hastes, queda e depreciação de frutos e até mesmo a morte de plantas (23, 28). Seu efeito sobre a produtividade e qualidade de frutos, ocasiona, via de regra, graves prejuízos econômicos (10, 15).

A “flor preta”, causada por *C. acutatum*, é considerada o principal problema fitossanitário da cultura do morangueiro (19), podendo causar perdas que variam entre 30 e 68 % (14). O fungo *C. fragariae* pode também, em pequena escala, produzir

sintomas da doença em flores (24). *C. acutatum* pode infectar, além das flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e parte superior do rizoma (25).

S. rolfsii é um organismo que faz parte da microbiota do solo. É considerado patógeno causador de podridão de raiz e colo, podendo atacar plantas em todos os seus estádios de desenvolvimento. Caracteriza-se pela inespecificidade em relação ao hospedeiro, podendo até sobreviver no solo na ausência do mesmo, nutrindo-se de matéria orgânica (fase saprofítica). Os danos provocados às raízes comprometem a absorção de água e nutrientes, prejudicando o desenvolvimento das plantas (1). As plantas mais jovens normalmente são mais sensíveis, podendo morrer rapidamente, enquanto as mais velhas demoram mais ou até mesmo nem chegam a morrer, mas tem a sua produtividade reduzida (6).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial dos extratos de três espécies de plantas e duas espécies de basidiomicetos nativos na inibição “in vitro” do crescimento micelial de *A. solani*, *C. acutatum* e *S. rolfsii*, da germinação de conídios de *A. solani* e *C. acutatum* e da germinação de escleródios de *S. rolfsii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados dos dois fungos, *Oudemansiella canarii* (CCB179) e *Irpex lacteus* (CCB196) foram fornecidas a partir da Coleção de Cultura de Basidiomicetos da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente-SP), mantidos em tubo inclinado com meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar), a 4°C. Os extratos das plantas fanerógamas nativas *Senna spectabilis*, *Senna multijuga* e

Avicennia schaueriana foram fornecidas pela extratoteca da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do mesmo Instituto e amostras das mesmas encontram-se depositadas no herbário SP.

Os três patógenos foram obtidos a partir de amostras apresentando sintomas das doenças coletadas em plantios comerciais no município de Piedade, SP, e mantidos em tubo inclinado com meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar), a 24°C na micoteca do Centro de P&D de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico. *C. acutatum* foi isolado a partir de flores de morangueiro, *A. solani* de folhas de tomateiro e *S. rolfsii* de raízes de beterraba.

Preparo dos extratos de *O. canarii* e *I. lacteus*

Os extratos fúngicos foram elaborados utilizando-se metodologia modificada a partir da empregada por Rosa et al. (22). Para o preparo do pré-inóculo, 3 discos de 5 mm do crescimento dos fungos em meio BDA foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de caldo extrato de malte, MEC (extrato de malte 2%, peptona 0,1% e glicose 1,5%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm a 28 °C, durante 5 dias. O conteúdo do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de MEC e incubados sob agitação de 150 rpm a 28 °C, durante 9 dias. Após esse período, o meio contendo a biomassa fúngica foi congelado a -10 °C, até o momento do preparo do extrato.

Para a extração, o meio de cultura e a biomassa fúngica foram descongelados e homogeneizados em um blander durante 1 min. O homogenato foi extraído com acetato de etila (5 x 30 mL). Após separação das fases, o solvente orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e o extrato concentrado em evaporador rotatório sob vácuo, em

temperaturas inferiores a 40 °C. Após a eliminação dos solventes, os extratos foram armazenados a -10 °C até a realização dos ensaios.

Preparo dos extratos etanólicos de *Senna spectabilis* e *Senna multijuga*

Flores de *S. spectabilis* e folhas de *S. multijuga* foram colocadas em sacos de papel aerados e secas em estufa a 40°C. Após a secagem, as folhas e as flores foram trituradas, separadamente em um liquidificador industrial tipo SIRE e posteriormente acondicionados em sacos de papel pardo. Para a obtenção dos extratos foi utilizado um aparelho de extração modelo ASE 300 – Accelerated Solvent Extractor. O material vegetal moído foi colocado em um compartimento do extrator chamado “cela”. Etanol comercial (92,8° INPM) foi utilizado como solvente de extração, a uma temperatura de 70 °C e um tempo de extração de 15 minutos. Os extratos etanólicos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotatório. Com o extrato parcialmente concentrado, a amostra foi distribuída em seis frascos de 5 mL e seca em banho-maria a 60 °C por 72 horas, para completa eliminação do solvente.

Obtenção da fração clorofórmica de *Avicennia schaueriana*

O pó de folhas secas de *A. schaueriana*. foi macerado em álcool etílico comercial (92,8° INPM) em temperatura ambiente por dez dias. Este processo foi repetido seis vezes. Após filtração, a solução etanólica obtida foi concentrada em evaporador rotatório e posteriormente levada ao banho-maria a 60 °C para eliminação completa do solvente e obtenção do resíduo etanólico bruto. Em seguida, o resíduo foi redissolvido com uma mistura de metanol/água destilada 8:2 e particionado com hexano por sete vezes. A fração hexânica obtida foi filtrada, e concentrada em evaporador

rotatório para obtenção do respectivo resíduo. À fração hidrometanólica foi adicionada água destilada até a obtenção da proporção metanol/água 6:4. A seguir, essa fração foi particionada com clorofórmio por seis vezes, originando após a eliminação do solvente o resíduo clorofórmico que foi utilizado nos experimentos.

Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos

O experimento foi realizado com todos os extratos em meio de cultura BDA que foi preparado e autoclavado por 30 min. a 120 °C. Os extratos vegetais e fúngicos foram dissolvidos previamente em acetona e dimetil sulfóxido, respectivamente. A seguir, foram adicionados ao BDA a 45 °C nas concentrações de 0 e 1000 µg.mL⁻¹ e vertidos em placas de Petri (5 cm Ø). Discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos patogênicos, 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.

Efeito dos extratos sobre a germinação de conídios de *C. acutatum* e *A. solani*.

Para o experimento de inibição da germinação de conídios, foi utilizado o método do celofane descrito por Nelly (18). Os extratos vegetais e fúngicos foram dissolvidos previamente em acetona e dimetil sulfóxido, respectivamente. Dez discos de papel celofane de 0,8 cm de diâmetro foram colocados em placas de Petri sobre discos de papel de filtro embebidos com 5 mL da solução de cada extrato nas concentrações 0 e 1000 µg.mL⁻¹, em triplicata. Posteriormente, uma gota de suspensão de conídios de *A.*

solani, e *C. acutatum*, 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 12 h e temperatura de 25°C.

A avaliação de germinação dos conídios foi feita transferindo-se os discos de celofane para uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma pinça, sobre a qual foram colocadas uma gota de água e uma lamínula. A observação foi feita em microscópio óptico após 16 h de incubação contando-se um total de 100 conídios e considerando-se como germinados, aqueles que apresentassem qualquer indício de formação do tubo germinativo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri com 10 discos de celofane.

Efeito dos extratos sobre a germinação de escleródios de *S. rolfsii*.

Dez escleródios de *S. rolfsii* foram inoculados em placas de Petri (5 cm Ø) contendo meio de cultura BDA e cada um dos extratos, preparadas de forma semelhante ao experimento de inibição do crescimento micelial descrito anteriormente e incubadas por 72 h a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada parcela sendo composta por 10 placas por extrato contendo 10 escleródios cada uma. A avaliação foi feita contando-se os escleródios germinados e calculando-se a porcentagem de germinação.

Em todos os experimentos realizados, tratamentos contendo dimetil sulfóxido, acetona e extrato de MEC foram utilizados como controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao experimento de inibição do crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. rolfsii* expressos na Tabela 1, demonstram que, nas condições em que os experimentos foram realizados, os extratos dos dois basidiomicetos foram mais eficientes do que os extratos vegetais testados, os quais não diferiram da testemunha. *O. canarii* foi o que proporcionou os melhores resultados atingindo a média de 84 % de inibição do crescimento micelial, além de não permitir a germinação de escleródios. A porcentagem de inibição pelo extrato de *I. lacteus* foi estatisticamente inferior ao de *O. canarii*, mas foi mais eficiente que os demais extratos. Dentre os extratos de plantas o que mais se destacou foi o de *A. schauermaniana* com 16 % de inibição do crescimento micelial, sendo semelhante aos de *S. spectabilis* e *S. multijuga* quanto à germinação de escleródios.

(INSERIR TABELA 1)

Os resultados obtidos nos experimentos com *A. solani* (tabela 2) foram semelhantes aos obtidos com *S. rolfsii*, com redução do crescimento micelial pelo extrato de *O. canarii* estatisticamente superior às provocadas pelos demais extratos. O extrato de *I. lacteus* proporcionou nível intermediário de inibição, com crescimento menor em relação aos demais extratos vegetais, os quais não diferiram da testemunha. Apenas o extrato de *O. canarii* não permitiu a germinação de conídios de *A. solani*. Os outros extratos não apresentaram nenhum grau de inibição da germinação.

(INSERIR TABELA 2)

O extrato de *O. canarii* foi o que proporcionou maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* (tabela 3). A inibição do crescimento pelo extrato

de *I. lacteus* foi estatisticamente superior aos extratos vegetais atingindo 50,7 % de inibição. *A. schaueriana*, *S. spectabilis* e *S. multijuga* não apresentaram ação sobre os patógenos, sendo semelhantes à testemunha. O extrato *O. canarii* foi o único a não permitir a germinação de nenhum conídio de *C. acutatum*. Os demais extratos proporcionaram valores entre 53,6 a 86,1 na porcentagem de germinação, configurando indução da germinação em relação à testemunha (30,4 %).

(INSERIR TABELA 3)

A ação antimicrobiana de metabólitos de basidiomicetos do gênero *Oudemansiella* foi descrita pela primeira vez por Anke et al. (3), a partir de estudos realizados com *O. mucida*. Os autores relataram que quanto à estrutura molecular, a substância ativa que foi isolada e estudada, a qual foi chamada de oudemansina, mostrou-se semelhante a estrobilurina A (C₁₆H₁₈O₃), estudada dois anos antes por Anke & Oberwinkler (2), e que depois de muitos anos de pesquisa deu origem no final dos anos 90, a um novo grupo de fungicidas utilizados amplamente na agricultura: as estrobilurinas. Tais fungicidas apresentam como mecanismo de ação característico, a interferência na respiração mitocondrial, bloqueando assim, a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1, através da inibição da óxido-redutase de ubihidroquinona-citocromo c. *O. canarii* provavelmente também produz oudemansina, o que explicaria o excelente desempenho verificado nos experimentos realizados neste trabalho.

A ação biocida de *I. lacteus* também já foi relatada por outros autores, inclusive sobre fitopatógenos. Hayashi et al. (12) estudando seus metabólitos obtiveram três substâncias que demonstraram elevada ação nematicida contra *Aphelencooides besseyi*. As frações L-1 e L-2 proporcionaram a morte de 50 % dos nematóides a 50 ppm e a

fração L-3 mostrou a mesma efetividade a 25 ppm. Mais recentemente, Koitabashi & Tsushima (16) incubando folhas de trigo inoculadas com *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, agente causal do oídio do trigo, na presença de *I. lacteus* sem que houvesse contato entre eles, verificaram alta inibição do patógeno por dois tipos de compostos voláteis: 5-pentil-2-furaldeído e 5-(4-pentenil)-2-furaldeído. Também verificaram o efeito supressivo de tais compostos sobre *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., gêneros de fungos de importância médica e agrícola.

O efeito da indução da germinação de conídios de *C. acutatum* observado nos experimentos com os extratos vegetais e de *I. lacteus*, foi verificado também por Bonaldo & Pascholati (8) com *Colletotrichum sublineolum* e *C. lagenarium*, podendo ser explicado pela presença de substâncias estimuladoras nos extratos, pela disponibilização de nutrientes ou pela inativação da micosporina-alanina, um auto inibidor de germinação já encontrado na mucilagem que envolve os conídios de outras espécies do gênero *Colletotrichum*.

A ausência de atividade verificada para os extratos de *S. spectabilis* e *S. multijuga* e a baixa atividade do extrato de *A. schaueriana*, deve-se, provavelmente, ou à não produção pelo seu metabolismo secundário de substâncias ativas ou à incapacidade de extração de tais substâncias pela metodologia utilizada.

Os resultados obtidos reforçam ainda mais a importância dos fungos basidiomicetos e de plantas fanerógamas da flora nacional como fontes de substâncias com elevada ação antifúngica para o controle de fitopatógenos na agricultura, justificando a preservação dos ecossistemas em que vivem e a necessidade urgente de serem melhor estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G. N. **Plant Pathology**. 4rd ed. San Diego: Academic Press. 1997. 635p.
2. Anke, T.; Oberwinkler, F. The strobilurins – new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.). **The Journal of Antibiotics**. Tokio, v.30, n.10, p.806-810. 1977.
3. Anke, T.; Hecht, H.J.; Schramm, G.; Steglich, W. Antibiotics from basidiomycetes. IX Oudemansin, an antifungal antibiotic from *Oudemansiella mucida* (Schader ex Fr.) Hoenel (Agaricales). **The Journal of Antibiotics**. Tokio, v.32, n.11, p.1112-1117. 1979.
4. Azevedo, L.A. S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. EMOPI Editora e Gráfica. Campinas. 2003. 320p.
5. Barlett, D.W.; Clough, J.M.; Godwin, J.R.; Hall, A.A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. The strobilurins fungicides. **Pest Management Science**. v.58, p.649-662. 2002.
6. Bedendo, I. P. Parte X: Grupos de Doenças. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorin, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.805-907.
7. Bennett, R.N.; Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Philadelphia, v.4, n.127, p.617-633. 1994.
8. Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F. Efeito de frações purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.233-238, 2007.

- 336 9. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos
337 Recursos Naturais Renováveis. **Estudos da Representatividade Ecológica nos**
338 **Biomás Brasileiros**. Brasília, 2007. Disponível em
339 <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/estudos.htm> >. Acesso em: 7 dez. 2007.
- 340 10. Dorozhin, N.A., Invanyuk, V. G. Epiphytatics of dry leaf spot of potato and tomato.
341 **Micologia y Fitopatologia**, v.13, p.314-21, 1979.
- 342 11. Harbone, J.B. **The plant and its biochemical adaptation to the environment**. New
343 York, Academic Press, 384p. 1994.
- 344 12. Hayashi, M.; Wada, K.; Munakata, K. New nematocidal metabolites from a fungus,
345 *Irpex lacteus*. **Agric. Biol. Chem.** v.45, n.6, p.1527-1529. 1981.
- 346 13. Heaney, S. P.; Knight, S. C. ICIA5504 a novel broad spectrum systemic fungicide
347 for use on fruit, nut and horticultural crops. **Brighton Crop Proct. Conf.** V.2, p.509-
348 16, 1996.
- 349 14. Henz, G. P.; Boiteux, L. S.; Lopes, C. A. Outbreak of strawberry anthracnose caused
350 by *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. St. Paul, **Plant Disease**, v. 76, n.2,
351 p.212. 1992.
- 352 15. Jones, J. B., Stall, R. E., Zitter, T. A. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul:
353 APS, 1993. 73p.
- 354 16. Koitabashi, M.; Tsushima, S. Studies of biocontrol of air-borne plant disease by a
355 filamentous fungus producing antifungal volatiles. **Japan Agricultural Research**
356 **Quarterly** : Japan, v.41, n.4, p.261-265. 2007.
- 357 17. Ming, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI. L.C. (Ed.) **Plantas**
358 **medicinais: Arte e Ciência** – Um Guia de Estudos Multidisciplinar. São Paulo: Ed.
359 Universidade Paulista. 1996. p.69-86.

- 360 18. Nelly, D. **Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation**
361 **fungicides, nematocides and bactericides**. Minnessota: American Phytopathological
362 Society, 140p. 1978.
- 363 19. Passos, F. A. Melhoria do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas.
364 In: Duarte Filho, J.; Cançado, G. M. A.; Regina, M. A.; Antunes, L. E. C.; Fadini, M.
365 A. M. (Ed.) **Morango: Tecnologia de produção e processamento**. Caldas:
366 EPAMIG, 1999. p.259-264.
- 367 20. Peixoto, A.L. ; Morim, M.P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade
368 brasileira. **Cienc. Cult.** [online]. July/Sept. 2003, vol.55, no.3 [cited 07 December
369 2007], p.21-24. Available from World Wide Web:
370 <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300016&lng=en&nrm=iso)
371 [=S0009-67252003000300016&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300016&lng=en&nrm=iso)>. ISSN 0009-6725
- 372 21. Pivatto, M.; Crotti, A.E.M.; Lopes, N.P.; Castro-Gamboa, I.; Rezende, A.; Viegas,
373 Jr., C.; Young, M.C.M.; Furlan, M.; Bolzani, V.S. Electrospray ionization mass
374 spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae)
375 extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. São Paulo,
376 **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p.1431-1438. 2005.
- 377 22. Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C.; Capelari, M.; Rosa, C.A.; Zani, C.L.
378 Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. **Memórias do**
379 **Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.967-974, 2003.
- 380 23. Sherf, A. F., Macnab, A. A. **Vegetable disease and their control**. Wiley
381 Interscience Publication, 1986, 728p.

- 382 24. Tanaka, M. A. S.; Passos, F. A. Caracterização cultural e morfológica de isolados de
383 *Colletotrichum* causadores de antracnose do morangueiro em São Paulo. **Summa**
384 **Phytopathologica**, v. 24, n.2, p.145-151, 1998.
- 385 25. Tanaka, M. A. S.; Betti, J. A.; Kimati, H. Doenças do morangueiro-*Fragaria x*
386 *ananassa* Duch. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Rezende, J. A.; Bergamin Filho, A.;
387 Camargo, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas**
388 **cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.489-499.
- 389 26. Tarik, M.; Dawar, S.; Mehdi, F.S.; Zaki, M.J. Use of *Avicennia marina* (Forsk.)
390 Vierh in the control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood
391 on Okra and Mash Bean. Ankara: **Turkish Journal Biology**, v.31, p.225-230. 2007.
- 392 27. Tello Marquina, J. C., Vega, J. D. M. Enfermedades no víricas del tomate. In:
393 Nuez, F. (Coord). **El cultivo del tomate**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. p.523-63.
394 1995.
- 395 28. Vale, F. X. R., Zambolim, L., Paul, P. A., Costa, H. Doenças causadas por fungos
396 em tomate. In : Zambolim, L., Vale, F. X. R. , Costa, H. (Eds) **Controle de doenças**
397 **de plantas – hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000, v.2, cap.21,
398 p.699-755.
399

400 **Tabela 1** – Crescimento micelial (diâmetro em cm), porcentagem de inibição do
 401 crescimento micelial e porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium rolfii*
 402 em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na
 403 concentração de 1000 µg.mL⁻¹ após 72 h de incubação.

Origem dos extratos	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Germinação de escleródios (%)
<i>Irpex lacteus</i>	2,7 c*	46,7	67,0 b*
<i>Oudemansiella canarii</i>	0,9 d	84,0	0,0 c
<i>Avicennia schaueriana</i>	4,2 b	16,0	100,0 a
<i>Senna spectabilis</i>	5,0 a	0,0	100,0 a
<i>Senna multijuga</i>	5,0 a	0,0	100,0 a
Testemunha	5,0 a	–	100,0 a
CV (%)	2,71959		4,97600

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

406

407

408

409 **Tabela 2** – Crescimento micelial (diâmetro em cm) e porcentagem de inibição em
 410 placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na
 411 concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após seis dias de incubação e porcentagem de
 412 germinação de conídios de *Alternaria solani* após 16 h de incubação.

Espécies e fungicida	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Germinação de conídios (%)
<i>Irpex lacteus</i>	3,4 b*	31,3	100,0
<i>Oudemansiella canarii</i>	1,5 c	69,3	0,0
<i>Avicennia schaueriana</i>	5,0 a	0,0	100,0
<i>Senna spectabilis</i>	5,0 a	0,0	100,0
<i>Senna multijuga</i>	5,0 a	0,0	100,0
Testemunha	5,0 a	–	100,0
CV (%)	0,80107		

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

415

416 **Tabela 3** – Crescimento micelial (diâmetro em cm) e porcentagem de inibição em
 417 placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na
 418 concentração de 1000 µg.mL⁻¹ após seis dias de incubação e porcentagem de
 419 germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* após 16 h de incubação.

Espécies e fungicida	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Germinação de conídios (%)
<i>Irpex lacteus</i>	2,5 b*	50,0	64,7 b
<i>Oudemansiella canarii</i>	0,8 c	83,3	0,0 e
<i>Avicennia schaueriana</i>	5,0 a	0,0	86,1 a
<i>Senna spectabilis</i>	5,0 a	0,0	53,6 c
<i>Senna multijuga</i>	5,0 a	0,0	63,2 bc
Testemunha	5,0 a	–	30,4 d
CV (%)	1,71674		7,60102

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos comprovam a viabilidade do estudo do metabolismo secundário das espécies de plantas fanerógamas e de fungos basidiomicetos como fonte de substâncias com potencial antifúngico. Resultados semelhantes também já foram obtidos no Brasil por vários outros autores.

Infelizmente, existe ainda uma grande dificuldade na transformação das descobertas científicas em produtos que possam ser utilizados pelos agricultores. Na opinião de Barata (2007), o Brasil tem competência científica em Agronomia, Biologia, Farmacotécnica e Química de Plantas Medicinais, além da maior biodiversidade vegetal do planeta. No entanto, praticamente não tem produtos derivados destas pesquisas porque os cientistas ainda estão longe das empresas, única instituição capaz de transformar conhecimento em produto.

Para Camargo (2005), existe nas universidades e nos institutos de pesquisa uma boa quantidade de conhecimentos acumulados e que não sabemos como transformar esse conhecimento em produto. O mesmo autor acrescenta que existe no Brasil competência humana para transformar o conhecimento em produto, mas não temos instrumentos nem tradição de fazer isso. Destaca que a indústria não usa esse conhecimento provavelmente devido à situação econômica desfavorável dos últimos tempos, o que torna o investimento em pesquisa mais caro. Seria mais viável comprar a tecnologia pronta. Outra causa provável seria a falta de preparo dos acadêmicos para isso. Na opinião de Marcuzzo (2007), a estabilidade econômica deverá colaborar para maiores investimentos na área.

Schwan-Estrada (2003) destaca como objetivo final das pesquisas realizadas nessa área, o desenvolvimento de uma tecnologia que possa ser repassada para pequenos produtores rurais ou os interessados em cultivo orgânico, onde formas alternativas de controle de doenças são necessárias. Tal opinião é compartilhada por outros autores que consideram que a utilização de produtos naturais não gera riscos nem à saúde humana nem ao ambiente como os agrotóxicos (Penteado 2001).

Todavia, de acordo com o artigo 2º da Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins (Brasil 1998), os produtos naturais também podem ser considerados como agrotóxicos, que são definidos como: os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. E ainda, no artigo 6º do capítulo III que trata do registro dos produtos, destaca que os agrotóxicos, seus componentes e afins, para serem produzidos, importados, exportados, comercializados e utilizados no Território Nacional, terão de ser previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da agricultura, da saúde e do meio ambiente. Conclui-se que, perante a lei, os produtos naturais também são agrotóxicos e que, portanto, não podem ser utilizados sem antes ser comprovada a sua eficiência e estabelecidos os limites toxicológicos para o ambiente e para a saúde humana.

O elevado potencial antifúngico dos extratos estudados neste trabalho pode ser comprovado quando são comparados com trabalhos realizados por outros autores com fungicidas comerciais, considerando-se que os extratos são na verdade, uma mistura de um número indeterminado de substâncias que, na maioria dos casos, ainda são desconhecidas. Da mesma forma, as concentrações das substâncias ativas presentes nos extratos ainda não foram determinadas. Por outro lado, as concentrações testadas nos experimentos com fungicidas se referem especificamente ao princípio ativo. Os resultados obtidos na inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* com os extratos hexânicos de *R. graveolens*, *A. sativum* e *I. walleriana* a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com o extrato de *O. canarii* a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram semelhantes aos obtidos por Kososki et al. (2001) pelos fungicidas sulfato de cobre, folpet e clorotalonil na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Töfoli (2002) estudando a ação de fungicidas na inibição do crescimento micelial de cinco

isolados de *A. solani* a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, verificou níveis de inibição com os fungicidas mancozeb e clorotalonil para dois isolados, semelhantes aos obtidos com os extratos hexânicos de *R. graveolens*, *A. sativum* e *I. walleriana* a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com o extrato de *O. canarii* a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quanto à porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* o extrato hexânico de *A. sativum* e o extrato de *O. canarii* foram altamente eficientes com valores nulos de germinação a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultados superiores aos fungicidas mancozeb e clorotalonil e semelhantes a tebuconazole e difenoconazole a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtidos por Töfoli (2002).

A preocupação com a resistência de fungos a fungicidas surgiu a partir da introdução dos fungicidas do grupo dos benzimidazóis em 1960. Após alguns anos de uso intensivo, começam a surgir os primeiros relatos de resistência com oídio em pepino cultivado em estufa nos Estados Unidos. Posteriormente, numerosos relatos começaram a surgir em outras culturas, marcando o início dos graves problemas com resistência na história dos fungicidas (Ghini & Kimati 2002).

Os produtos naturais também estarão sujeitos a problemas com resistência a partir do momento que forem sendo empregados em escalas cada vez maiores. Os fungicidas do grupo das estrobilurinas, são um bom exemplo desse risco potencial. Introduzidos nos anos 90 e considerados como produtos de origem natural, apresentam modo de ação bastante específico: interferem na respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons pelo complexo do citocromo bc1, através da inibição da oxido-redutase de ubihidroquinona-citocromo c (Ghini & Kimati 2002). Por esse motivo, Brent & Hollomon (1998) consideram esse grupo como de risco moderado de resistência, portanto, o seu uso deve ser recomendado em programas que restrinjam o número de aplicações e utilizem misturas ou uso intercalado desses produtos com fungicidas inespecíficos ou modo distinto de ação. O mesmo modo de ação é compartilhado pelo fungicida famoxadone (grupo das oxazolidinediona) que não é de origem natural e por produtos que porventura venham a ser desenvolvidos a partir da oudemansina A, metabólito produzido pelo fungo *Oudemansiella mucida* e cuja molécula tem estreita semelhança estrutural com a estrobilurina A (Anke et al. 1979). Dessa

forma, estudos visando: mensurar o risco do surgimento de estirpes resistentes, o monitoramento constante das populações dos fungos no campo e a adoção de estratégias anti-resistência devem ser realizados também para os produtos naturais.

Um dos mais graves problemas que afetam as pesquisas com espécies brasileiras é a delapidação dos ecossistemas em que vivem. A flora brasileira é considerada a mais rica do mundo com cerca de 56.000 espécies de plantas (Brasil 2007a). No caso dos fungos as estimativas indicam existirem no Brasil entre 12,5 e 13,5 mil espécies (Peixoto & Morim 2003). Com exceção de espécies de importância medicinal, muito pouco conhecemos a respeito da composição química de 99,6 % das espécies de plantas da flora brasileira (Ming 1996). A biodiversidade brasileira representa um importantíssimo recurso natural, de valor econômico inquestionável, o que torna imprescindível a sua preservação e a gestão de seu uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N.** 1997. Plant Pathology. 4.ed. Academic Press, San Diego, 635p.
- Ammermann, E., Lorenz, G. & Schelberger, K.** 1992. Basf 490f a broad spectrum fungicides with a new mode of action. Proceedeing of the British Crop Protection Conference 2: 589-598.
- Anke, T., Hecht, H.J., Schramm, G. & Steglich, W.** 1979. Antibiotics from basidiomycetes. IX oudemansin, an aintifungal antibiotic from *oudemansiella mucida* (schader ex fr.) Hoenel (agaricales). The Journal of Antibiotics. Tokio, 32 (11):1112-1117.
- Azevedo, L.A. S.** 2003. Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional. Emopi Editora e Gráfica. Campinas, 319p.
- Barata, L. E. S.** 2007. Fitoterápico verde-e-amarelo só com P&D e inovação. Jornal Brasileiro de Fitomedicina 5(3): 113.
- Barlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B.** 2002. The strobilurins fungicides. Pest Management Science 58: 649-662.
- Barros, S.T.; Oliveira, N.T. & Maia, L.C.** 1995. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. Summa Phytopathologica 21(2): 168-170.
- Basu, P. K.** 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. Canadian Plant Diseases 54: 45-51.
- Bedendo, I. P.** 1995. Parte X: Grupos de Doenças. In: A. Bergamin Filho; H. Kimati,; L. Amorin, (eds.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 3. ed. Ceres, São Paulo v.1, pp.805-907.
- Bennett, R.N. & Wallsgrove, R.M.** 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New phytologist, Philadelphia v.4, n.127, p.617-633.

- Bernardo, R.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Cruz, M. E. S.; Pascholati, S. F.** 1998. Fungitoxicidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 227.
- Bettiol, W.** 1997. 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. pp.52-63.
- Blachinsck, D., Shtienberg, D., Dinoor, A., Kafkafi, V., Sujkowski, L.S. & Zitter, T.A.** 1996. Influence of foliar application of nitrogen and potassium on alternaria disease in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica*, 24: 281-292.
- Bolkan, H.A. & Ribeiro, W.R.C.** 1981. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira* 6(1): 565-566.
- Bonaldo, S. M., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Tessmann, D. J. & Scapim, C. A.** 2004. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, 29: 128-134.
- Brasil.** 1998. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins. Departamento de Defesa e Inspeção Federal, 184p.
- Brasil.** 2007a. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estudos da representatividade ecológica nos biomas brasileiros. <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/estudos.htm> (acesso em: 7.10.2007).
- Brasil.** 2007b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Agrofit – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. (acesso em: 22.10.2007).
- Brent, K. J. & Hollomon, D. W.** 1998. Fungicide Resistance: the assessment of risk - FRAC Monograph, n.2. Global Crop Protection Federation. Bruxelas, 48p.

- Camargo, E.** 2005. Presidente da maior agência de apoio à pesquisa do País afirma que a baixa demanda pelos recursos limita o apoio à inovação. <http://www.inovação.unicamp.br> (acesso em 6.11.2007).
- Chalfoun, S.M. & Carvalho, V.D.** 1987. Efeito do extrato e de óleo industrial sobre o desenvolvimento de fungos. *Fitopatologia Brasileira* 12(3): 234-235.
- Datar, V. V. & Mayee, C. D.** 1981. Assessment of losses in tomato yield due to early blight. *Indian Phytopathology*, 34: 191-195.
- Dekker, J. & Georgopoulos, S.G.** 1982. Fungicide resistance in crop protection. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- Dias, A. S.** 1999. Comercialização do morango no ETPS do Ceagesp. In: J. Duarte Filho, G. M. A. Cançado, M. A. Regina, L. E. C. Antunes, M. A. M. Fadini (ed.) *Morango: Tecnologia de Produção e Processamento*. Epamig: Caldas, pp.225-236.
- Dias, M. S., Carbonari, R. & Souza, N. L.** 1994. Variações patogênicas, morfológicas e culturais entre *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum fragariae* isolados de morangueiro cv. Campinas. *Summa Phytopathologica* 17 (supl.): 48.
- Dorozhin, N.A. & Invanyuk, V. G.** 1979. Epiphytatics of dry leaf spot of potato and tomato. *Micologia.y Fitopatologia* 13: 314-321.
- Douglas, D. R. & Pavék, J. J.** 1972. Screening potatoes for yield resistance to early blight. *American Potato Journal* 49: 1-6.
- Duarte, M. & Albuquerque, F.C.** 1971. Tomato diseases in the amazon region. *Fitotecnia*, 292: 9-34.
- Eastburn, D. M. & Gubler, W. D.** 1990. Strawberry anthracnose: detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. *Plant Disease* 74(2): 161-163.
- Ehlers, E.** 1997. Sistemas orgânicos e sustentabilidade agrícola. In: *Anais do 2º Ciclo de Palestras sobre Agricultura Orgânica*, São Paulo, pp.1-10.

- Garbor, B. & Wieb, W.** 1997. Tomato Diseases: a practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Saticoiy.
- Ghini, R & Kimati, H.** 2002. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna.
- Ghini, R. & Bettiol, W.** 1995. Controle e manejo: controle físico IX. *In*: A. Bergamin Filho, H. Kimati, L. Amorin, (eds.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos, 3. São Paulo: pp. 786-801.
- Harbone, J.B.** 1994. The plant and its biochemical adaptation to the environment. Academic Press, New York.
- Heaney, S. P. & Knight, S. C.** 1994. ICIA5504 a novel broad spectrum systemic fungicide for use on fruit, nut and horticultural crops. Brighton Crop Protection Conference 2: 509-16.
- Henz, P.C. & Heifschneider, F.J.** 1990. Surto de antracnose em morangueiro no Distrito Federal. Horticultura Brasileira 8(1): 122.
- Henz, G. P., Boiteux, L. S. & Lopes, C. A.** 1992. Outbreak of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. Plant Disease 76: 212.
- Igarashi, S.** 1984. Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. do morango (*Fragaria* spp). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, SP. 57p.
- Jones, J. B., Stall, R. E. & Zitter, T. A.** 1993. Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society, Saint Paul.
- Kimati, H.** 1995. Controle químico. *In*: A. Bergamin Filho, H. Kimati, L. Amorin, (eds.) Manual de Fitopatologia, 1: Princípios e Conceitos. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 761-785.
- Kososki, R. M., Furlanetto, K., Tomita, C. K. & Café Filho, A. C.** 2001. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. Fitopatologia Brasileira 26(3): 662-666.
- Kurozawa, C. & Pavan, M. A.** 2005. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). *In*: H. Kimati, L. Amorin, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo (eds.). Manual de

Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, pp. 607-626.

Maffia, L. A., Martins, M. C. & Matsuoka, K. 1980. Doenças do tomateiro. Informe Agropecuário 6: 42-60.

Marcano, D.A.; Vargas, N. & Pire, A. 2005. Efecto de extratos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento in vitro de *Sclerotium rolfii* y *Thielaviopsis basicola*. Caracas, Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 22(4): 315-323.

Marcuzzo, O. 2007. Brasil investe pouco em patente científica, diz presidente da Finep. <http://idgnow.uol.com.br> (acesso em: 3.11.2007).

Messiaen, C., Blancard, D., Rouxel, F. & Lafon, R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ediciones Mundi Prensa: Madri.

Miguel, E. G., Ferreira, L. R., Donega, M. A., Dias-Arieira, C. R. & Avila, M. R. 2006. Atividade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento de *Colletotrichum* spp.. Summa Phytopathologica, 32 (supl.) S.18-S.18.

Ming, L.C. 1996. Coleta de plantas medicinais. In: L.C. Di Stasi (ed.) Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudos multidisciplinar. Universidade Paulista: São Paulo, pp.69-86.

Mizubuti, E. S. G. & Brommonschenkel, S. H. 1996. Doenças causadas por fungos em tomateiro. Informe Agropecuário 18: 42-60.

Pascholati, S. F. & Leite, B. 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: W. C. Luz (ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas. Paço Fundo, v.2, pp. 1-52.

Passos, F. A. 1999. Melhoramento do morangueiro no instituto agrônomo de campinas. In: J. Duarte Filho, G. M. A. Cançado, M. A. Regina, L. E. C. Antunes, M. A. M. Fadini (ed.) Morango: tecnologia de produção e processamento. EPAMIG, Caldas, pp.259-264.

Patil, L. K., Wani, P. V. & Kale, K. D. 1981. Host range studies of *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* isolated from early blight of potato. Natural Academy of Sciences 4: 9-11.

- Peixoto, A.L. & Morim, M.P.** 2003. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. Ciência e Cultura. http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0009-67252003000300016&lng=en&nrm=isso (acesso em: 07/12/2007).
- Penteado, S. R.** 2001. Defensivos alternativos e naturais – “para uma agricultura saudável”. Ed. Grafimagem, Campinas.
- Pinto, C. M. F., Maffia, L. A., Casali, V. W. D. & Cardoso, A. A.** 1998. In vitro effect of plant leaf extracts on micelial growth and sclerotium germination of *Slcerotium cepivorum*. Journal of Phytopathology. Berlin, 145(8-9): 421-425.
- Ribeiro, L. F. & Bedendo, I. P.** 1999. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. Scientia Agrícola 56(4): 1267-1271.
- Rosa, L.H., Machado, K.M.G., Jacob, C.C., Capelari, M., Rosa, C.A., Zani, C.L.** 2003. Screening of brazilian basisiomycetes for antimicrobial activity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98(7): 967-974.
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R. & Cruz, M. E. S.** 2003. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: Anais do 36 ° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fitopatologia Brasileira 28: 54-56.
- Sherf, A. F., & Macnab, A. A.** 1986. Vegetable disease and their control. Wiley Intercience Publication, 728p.
- Tanaka, M. A. S. & Passos, F. A.** 1998. Caracterização cultural e morfológica de isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose do morangueiro em São Paulo. Summa Phytopathologica 24(2): 145-151.
- Tanaka, M. A. S., Betti, J. A. & Kimati, H.** 2005. Doenças do morangueiro - *Fragaria x ananassa* Duch. In: H. Kimati, L. Amorin, J. A. Rezende, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo (eds.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres, v.2, p.489-499.

- Tanaka, M. A. S., Passos, F. A., Betti, J. A., Pires, R. C. M. & Tavares, E. M.** 2000. Reação de cultivares de morangueiro a *Colletotrichum acutatum*. Summa Phytopathologica 26 (supl.): 106.
- Tello Marquina, J. C. & Vega, J. D. M.** 1995. Enfermedades no víricas del tomate. In: F. Nuez (coord). El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp523-563.
- Töfoli, J. G.** 2002. Ação de acibenzolar-S-methyl no controle da pinta preta do tomateiro. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 123p.
- Tokeshi, H. & Carvalho, P. C. T.** 1980. Doenças do tomateiro: *Lycopersicon esculentum* Mill. In: F. Galli (coord.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, v.2 pp.511-552.
- Valarini, J.P., Friguetto, R. T. S. & Melo, I. S.** 1994. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* (capim-limão) no controle de fitopatógenos do feijoeiro. Revista de agricultura 69:139-150.
- Vale, F. X. R., Zambolim, L., Paul, P. A. & Costa, H.** 2000. Doenças causadas por fungos em tomate. In: L. Zambolim, F. X. R. Vale, H. Costa (eds) Controle de Doenças de Plantas – Hortaliça. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v.2, pp.699-755.
- Zambolim, L., Costa, H. & Vale, F. X. R.** 2000. Situação atual do controle químico de doenças de hortaliças. Horticultura Brasileira 18 (supl.) pp.96-110.

ANEXO 1

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) e porcentagem de inibição em relação à testemunha de *Sclerotium. rolfsii*, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+extratos vegetais na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	204.51020	12.78189	80.9784 **
Resíduo	34	5.36667	0.15784	
Total	50	209.87686		
Coeficiente de variação em %: 12.13295				
Média geral: 3.27451				
Diferença mínima significativa=1.21071				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) e porcentagem de inibição em relação à testemunha de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+extratos vegetais na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	56.75255	3.54703	27.3674 **
Resíduo	34	4.40667	0.12961	
Total	50	61.15922		
Coeficiente de variação em %: 10.89647				
Média geral: 3.30392				
Diferença mínima significativa=1.09709				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) e porcentagem de inibição em relação à testemunha de *Alternaria solani* em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+extratos vegetais na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	130.89176	8.18274	439.1763 **
Resíduo	34	0.63333	0.01863	
Total	50	131.52510		
Coeficiente de variação em %: 3.91045				
Média geral: 3.49020				
Diferença mínima significativa=0.13607				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Sclerotium rolfsii* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	52.54944	10.50989	53.2896 **
Resíduo	12	2.36667	0.19722	
Total	17	54.91611		
Coeficiente de variação em %: 6.70054				
Média geral: 6.62778				
Diferença mínima significativa=1.21790				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Sclerotium rolfsii* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	76.20444	15.24089	256.3888 **
Resíduo	12	0.71333	0.05944	
Total	17	76.91778		
Coeficiente de variação em %: 4.86543				
Média geral: 5.01111				
Diferença mínima significativa=0.66863				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Sclerotium rolfsii* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	165.53611	33.10722	551.7870 **
Resíduo	12	0.72000	0.06000	
Total	17	166.25611		
Coeficiente de variação em %: 9.32153				
Média geral: 2.62778				
Diferença mínima significativa=0.67175				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	2.37778	0.47556	18.6087 **
Resíduo	12	0.30667	0.02556	
Total	17	2.68444		
Coeficiente de variação em %: 1.82814				
Média geral: 8.74444				
Diferença mínima significativa=0.43841				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	11.41333	2.28267	22.7006 **
Resíduo	12	1.20667	0.10056	
Total	17	12.62000		
Coeficiente de variação em %: 4.20936				
Média geral: 7.53333				
Diferença mínima significativa=0.86963				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	43.03333	8.60667	98.6752 **
Resíduo	12	1.04667	0.08722	
Total	17	44.08000		
Coeficiente de variação em %: 4.94973				
Média geral: 5.96667				
Diferença mínima significativa=0.80993				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Alternaria solani* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	24.83333	4.96667	22.6904 **
Resíduo	12	2.62667	0.21889	
Total	17	27.46000		
Coeficiente de variação em %: 6.98292				
Média geral: 6.70000				
Diferença mínima significativa=1.28305				

Crescimento micelial (diâmetro médio em cm) de *Alternaria solani* em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais hexânicos na concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	62.25833	12.45167	61.0708 **
Resíduo	12	2.44667	0.20389	
Total	17	64.70500		
Coeficiente de variação em %: 9.00081				
Média geral: 5.01667				
Diferença mínima significativa=1.23831				

Porcentagem de germinação de conídios de *Alternaria solani* pelo método do celofane (Nelly, 1978) após 16 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (10 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	46974.97294	2935.93581	127.9351**
Resíduo	34	780.25333	22.94863	
Total	50	47755.22627		
Coeficiente de variação em %: 5.88184				
Média geral: 81.44510				
Diferença mínima significativa=14.59844				

Porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* pelo método do celofane (Nelly, 1978) após 16 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (10 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	42526.85294	2657.92831	467.5255**
Resíduo	34	193.29333	5.68510	
Total	50	42720.14627		

Coeficiente de variação em %: 6.91547

Média geral: 34.47843

Diferença mínima significativa=7.26603

Porcentagem de germinação de *Sclerotium. rolfsii* em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos vegetais na concentração de 1000 µg/mL após 72 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (10 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	16	2933.42353	183.33897	243.7086**
Resíduo	153	115.10000	0.75229	
Total	169	3048.52353		

Coeficiente de variação em %: 12.29764

Média geral: 7.05294

Diferença mínima significativa=1.36400

ANEXO 2

Crescimento micelial (diâmetro em cm) de *Sclerotium. rolfsii* em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, após 72 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	44.28444	8.85689	839.0737 **
Resíduo	12	0.12667	0.01056	
Total	17	44.41111		
Coeficiente de variação em %: 2.71959				
Média geral: 3.77778				
Diferença mínima significativa=0.28176				

Porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium. rolfsii* em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, após 72 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (10 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	814.08333	162.81667	1085.4444 **
Resíduo	54	8.10000	0.15000	
Total	59	822.18333		
Coeficiente de variação em %: 4.97600				
Média geral: 7.78333				
Diferença mínima significativa=0.51140				

Crescimento micelial (diâmetro em cm) de *Alternaria solani* em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ após seis dias de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	30.74944	6.14989	5534.9000 **
Resíduo	12	0.01333	0.00111	
Total	17	30.76278		

Coeficiente de variação em %: 0.80107

Média geral: 4.16111

Diferença mínima significativa=0.09141

Crescimento micelial (diâmetro em cm) de *Colletotrichum acutatum* em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA + extratos ou fungicida na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ após seis dias de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (3 repetições)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	48.89167	9.77833	2200.1250 **
Resíduo	12	0.05333	0.00444	
Total	17	48.94500		

Coeficiente de variação em %: 1.71674

Média geral: 3.88333

Diferença mínima significativa=0.18283

Porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* pelo método do celofane após 16 h de incubação.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Delineamento experimental: Inteiramente Casualizado (três repetições).

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma do quadrado	Quadrado médio	Variável do teste F
Tratamentos	5	13772.75778	2754.55156	193.3622 **
Resíduo	12	170.94667	14.24556	
Total	17	13943.70444		

Coeficiente de variação em %: 7.60102

Média geral: 49.65556

Diferença mínima significativa=10.35077