

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Agaricus brasiliensis* SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Pseudocercospora vitis*

Carla Garcia^{1*}, Tainara Menegassi², Kamila Cardozo de Souza³, Cacilda Márcia Rios Faria⁴

SAP 20767 Data envio: 08/10/2018 Data do aceite: 10/12/2018
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 18, n. 1, jan./mar., p. 48-52, 2019

RESUMO - A viticultura no Brasil pode ter sua expansão limitada devido à ocorrência de doenças como a mancha-das-folhas de videira causada pelo fungo *Pseudocercospora vitis*. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito fungitóxico da suspensão miceliada aquosa (SMA) do cogumelo *Agaricus brasiliensis* no crescimento micelial e na esporulação de *P. vitis*. Foram adicionadas ao meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) as doses de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% de SMA (com e sem adição de antibiótico no meio de cultura). Posteriormente repicou-se um disco de 8 mm de diâmetro de micélio de *P. vitis* no centro de cada placa de Petri. Na sequência foram incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 25 ± 1°C. Passados 48 h da montagem do experimento, avaliou-se a cada 24 h, por cinco dias, o crescimento micelial do diâmetro da colônia. Com esses dados determinou-se o índice de velocidade de crescimento micelial. Em seguida adicionou-se 10 mL de água destilada em cada placa e retirou-se a suspensão contendo esporos fúngicos, quantificados em câmara de Newbauer. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 6 tratamentos e 5 repetições. A suspensão miceliada aquosa de *A. brasiliensis* em 10% e apenas autoclavada reduz o crescimento micelial e inibe a esporulação de *P. vitis*. A adição de antibiótico no meio BDA reduziu o efeito antifúngico da suspensão miceliada aquosa de *A. brasiliensis*.

Palavras-chave: controle alternativo, microbiologia, mancha-das-folhas, *Vitis* sp..

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE *Agaricus brasiliensis* ON MYCELIAL GROWTH AND SPORULATION OF *Pseudocercospora vitis*

ABSTRACT - Viticulture in Brazil may have its expansion limited due to the occurrence of diseases such as vine leaf spot caused by the fungus *Pseudocercospora vitis*. In view of the above, the objective of this work was to evaluate the fungitoxic effect of the aqueous mycelial suspension (AMS) of the mushroom *Agaricus brasiliensis* on mycelial growth and sporulation of *P. vitis*. The doses of 0.1, 5, 10, 15 and 20% of AMS (with and without antibiotic addition in the culture medium) were added to the PDA (potato-dextrose-agar) culture medium. An 8 mm diameter disc of *P. vitis* mycelium was then peeled into the center of each Petri dish. They were then incubated in a growth chamber (BOD) at 25 ± 1 ° C. After 48 h of the assembly of the experiment, the mycelial growth of the colony diameter was evaluated every 24 h for five days. With these data the rate of mycelial growth rate was determined. Then 10 mL of distilled water was added to each plate and the suspension containing fungal spores quantitated in Newbauer's chamber was removed. The experimental design was completely randomized, containing 6 treatments and 5 replicates. The aqueous mycelial suspension of *A. brasiliensis* in 10% and only autoclaved reduces mycelial growth and inhibits sporulation of *P. vitis*. The addition of antibiotic in the PDA medium reduced the antifungal effect of *A. brasiliensis* aqueous mycelia suspension.

Keywords: alternative control, microbiology, leaf blot, *Vitis* sp..

INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil destaca-se por sua contribuição econômica e social do país. Porém essa expansão pode apresentar limitações devido à incidência de doenças, que interferem na qualidade e produtividade da uva. Dentre elas, destaca-se a mancha-das-folhas da videira, que apresenta como agente etiológico o fungo *Pseudocercospora vitis* (Léveillé) Spegazzini, 1910 (MAIA et al., 2014; RITSCHER et al., 2018).

Essa doença, corriqueiramente, ocorre no final do ciclo da videira e pode ocasionar queda prematura das folhas. Esse processo reduz a área fotossintética ativa da planta, o que limita o acúmulo de carboidratos e desencadeia impactos negativos no florescimento e no rendimento da cultura nos próximos anos (LIANG et al., 2016).

Para o controle da mancha-das-folhas, são utilizados fungicidas sintéticos, que apesar de eficientes,

¹Bióloga, Doutora em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), Rua Simeão Varela de Sá, 3, Bairro Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava, Paraná, Brasil. E-mail: carlagarciaagro@gmail.com. *Autora para correspondência.

²Eng. Agrônoma, Mestranda em Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Avenida Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. E-mail: taimenegassi@usp.br.

³Eng. Agrônoma, Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), Rua Simeão Varela de Sá, 3, Bairro Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava, Paraná, Brasil. E-mail: kamila-cardozo@hotmail.com.

⁴Eng. Agrônoma, Professora, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), Rua Simeão Varela de Sá, 3, Bairro Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava, Paraná, Brasil. E-mail: criosfaria@hotmail.com.

podem ocasionar problemas de saúde aos produtores, consumidores e poluição ambiental (PONS et al., 2018). Como forma de eliminar esses problemas tem-se como alternativa o emprego de substâncias encontradas nos basidiomicetos, que podem atuar como agentes antifúngicos biocontroladores de doenças de plantas (ISHIHARA et al., 2018).

O comportamento fungitóxico adquirido por esses cogumelos é proveniente de seu próprio desenvolvimento, por meio de metabólitos tais como enzimas, polissacarídeos e compostos fenólicos, que podem atuar como substância antimicrobiana (HELENO et al., 2015; STAJIC et al., 2017).

O gênero *Agaricus* sp. responde a essas características, principalmente, por apresentar em sua composição compostos fenólicos e benzoquinonas que atuam diretamente no desenvolvimento de microorganismos. A parede celular, desses cogumelos, é ricamente composta por β -glucanos e ácidos linoleicos que, também, possuem ação antimicrobiana (SMIDERLE et al., 2013; AGATA e WLODZIMIERZ, 2017; BHUSHAN e KULSHRESHTHA, 2018).

O mesmo efeito foi verificado por Garcia et al. (2018) quando utilizaram a dose de 10% da suspensão do micélio do cogumelo *Agaricus brasiliensis*, houve uma redução em 80% na germinação de esporângios de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira, com apenas 4 horas de contato do tratamento com o patógeno.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar o efeito fungitóxico da suspensão miceliada aquosa do cogumelo *Agaricus brasiliensis* no crescimento micelial e na esporulação de *P. vitis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dois experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), em Guarapuava, Paraná.

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* foi isolado a partir do corpo de frutificação de uma cultura comercial e pertence a micoteca do laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos, da UNICENTRO. Para a produção de micélios, seguiu-se a metodologia proposta por Dalla Santa et al. (2009).

Para obter a suspensão miceliada aquosa (SMA) de *Agaricus brasiliensis*, o micélio (com 94% de umidade) foi descongelado e pesado, de acordo com a dose determinada para os experimentos, sendo, em seguida macerado em almofariz. Posteriormente, adicionou-se água destilada à maceração e triturado em liquidificador por dois minutos.

Para verificar o efeito fungitóxico da SMA de *Agaricus brasiliensis* sobre *Pseudocercospora vitis*, foram adicionadas ao meio BDA (batata-dextrose-ágar) as doses de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% de SMA, que, posteriormente, foram autoclavados durante 20 min a 121°C e pressão de 1 atm. Em outro experimento adotou-se essa mesma metodologia, com os mesmos tratamentos, porém

adicionados 0,2 mg L⁻¹ de amoxicilina ao meio de cultura BDA. Esses procedimentos foram realizados com base em pré-testes, onde verificou-se com o aumento da concentração da SMA adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem, ocorreu elevada contaminação por bactérias.

Em seguida, os meios de cultura foram vertidos em placas de petri de 7 cm de diâmetro. Após a solidificação e resfriamento, adicionou-se disco de 8 mm de diâmetro de micélio de *Pseudocercospora vitis*, no centro de cada placa, sendo incubados em câmara de crescimento (BOD) a 25 ± 1°C. Após 48 h avaliou-se o crescimento micelial, pelo diâmetro da colônia, com auxílio de paquímetro digital. As avaliações prosseguiram a cada 24 h, até que a colônia de *P. vitis* do tratamento testemunha crescesse em toda a placa, totalizando cinco avaliações.

Para observar o efeito de controle sobre a velocidade de crescimento do patógeno, utilizou-se os dados de crescimento para determinar o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Para isso aplicou-se a fórmula proposta por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum(D - Da)/N$$

Onde:

D = diâmetro médio atual da colônia,

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a inoculação.

Após o término das avaliações do crescimento micelial, adicionou-se 10 mL de água destilada em cada placa e com auxílio da alça de drigalski retirou-se a suspensão fúngica e armazenou-se em tubo tipo falco. Posteriormente, os esporos foram quantificados em câmara de Newbauer com auxílio de microscópio óptico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 6 tratamentos e 5 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativo realizou-se a regressão polinomial, a 5% de probabilidade de erro, pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, verificou-se efeito quadrático em função das doses de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% da SMA de *Agaricus brasiliensis*, no IVCM de *P. vitis*. Observou-se, que a dose de 10% do tratamento apenas autoclavado reduziu em 16% essa variável, porém as doses 15% e 20%, aumentaram em 5,4% e 3%, respectivamente, o IVCM, em comparação à testemunha (Figura 1A).

Quando adicionado antibiótico ao meio de cultura, as doses 5%, 15% e 20% não apresentaram diferença estatística da testemunha. Porém a dose de 1% reduziu o IVCM em, aproximadamente, 3% e a dose de 10% aumentou em 5% do IVCM do patógeno, também em relação à testemunha (Figura 1B). A adição do antibiótico ao meio de cultivo para o controle do *Pseudocercospora vitis* não favoreceu o efeito fungistático da SMA de

Agaricus brasiliensis. Fato que é comprovado com os resultados de controle obtidos com a dose de 10% dos

tratamentos somente autoclavados em que não se verificou redução do IVCM do patógeno (Figura 1A).

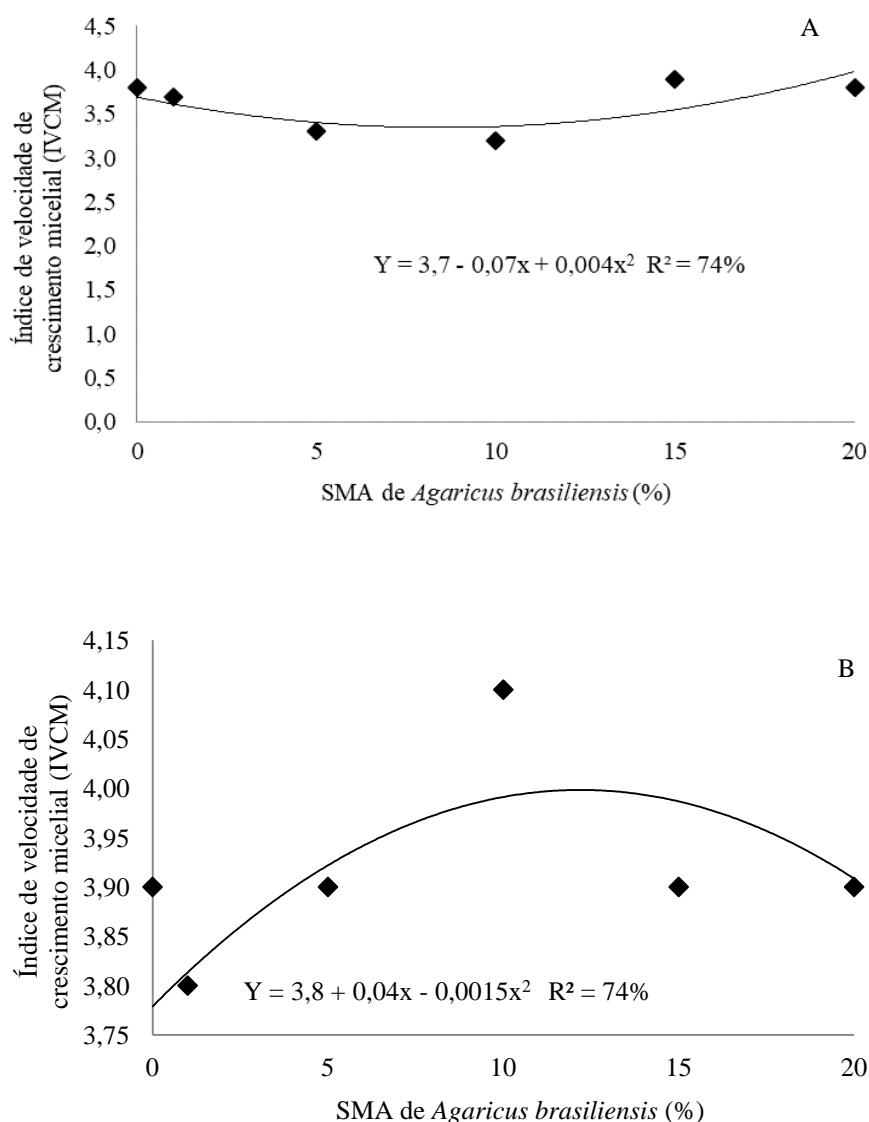


FIGURA 1 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Pseudocercospora vitis* tratado com as doses de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% da suspensão miceliada aquosa (SMA) de *Agaricus brasiliensis* somente autoclavadas (A) e autoclavadas com adição de antibiótico (B).

Os tratamentos que estimularam o desenvolvimento de *Pseudocercospora vitis*, podem estar relacionados com o alto teor de polissacarídeos presentes no micélio de *A. brasiliensis*, que permitem que esse cogumelo seja considerado como importante fonte alimentar (RZYMSKI et al., 2017). Esses compostos em elevadas concentrações nos tratamentos testados, possivelmente, atuaram como fontes de carbono para o desenvolvimento do *P. vitis*. Porém nas doses menores, em que não se observaram efeito de controle do IVCM, possivelmente, pode estar relacionada com a baixa concentração dos compostos antimicrobianos (OLIARI et al., 2014). Garcia et al. (2018) também relataram que a

concentração de 1% da SMA de *Agaricus brasiliensis* aumentou em 7% a germinação de esporângios de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio, porém o tratamento com 10% ocorreu redução de 81%.

Para o experimento em que os tratamentos foram apenas autoclavados, não ocorreu à esporulação de *Pseudocercospora vitis*. Esse resultado pode ser relacionado com a característica de lento crescimento micelial e baixa esporulação de acordo com o meio de cultivo em que esse patógeno se desenvolve (MAIA et al., 2015).

Esfahani et al. (2016) também ressalta que os micro-organismos podem apresentar comportamentos

adversos de acordo com as condições de cultivo, principalmente, com relação ao aumento da esporulação. Situação que foi observada com a adição de antibiótico no meio de cultura, onde ocorreu esporulação de *Pseudocercospora vitis*. Porém o tratamento com a dose de 10% da SMA de *Agaricus brasiliensis*, reduziu em, aproximadamente, 90% a esporulação, em relação ao

tratamento testemunha (Figura 2). Esse controle de esporulação de patógeno mostra-se muito efetivo, pois é por essas estruturas que permite à contaminação de plantas sadias e, o consequente, desenvolvimento da mancha-das-folhas nas videiras, causando redução da produtividade nos vinhedos (LIANG et al., 2016).

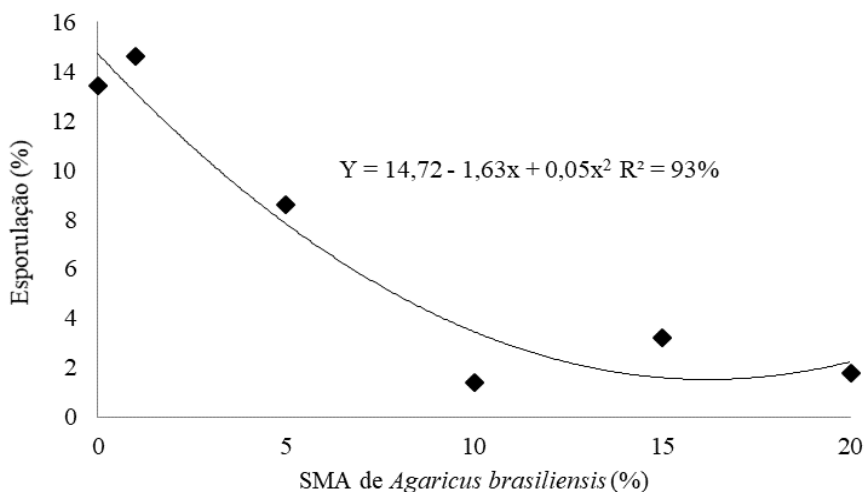


FIGURA 2 - Esporulação de *Pseudocercospora vitis* tratado com a suspensão miceliada aquosa (SMA) de *Agaricus brasiliensis* nas doses de 0, 1, 5, 10, 15 e 20% autoclavadas com adição de antibiótico.

Ressalta-se também que esses resultados, podem estar associados com a composição química do micélio de *Agaricus brasiliensis* ricamente composta por β -glucanos, ácidos linoleicos e compostos fenólicos, que se destacam por desencadearem ação antimicrobiana. Entretanto podem apresentar variações em seus efeitos proporcionados de acordo com a forma de extração (STANGARLIN et al., 2011; BHUSHAN; KULSHRESHTHA, 2018; DU et al., 2018). Dessa forma, Souza et al. (2016) destacam a importância de realizar a purificação desses compostos, para que possa potencializar o efeito negativo sobre o desenvolvimento do patógeno.

Com isso evidencia-se que a SMA do cogumelo *Agaricus brasiliensis* apresenta a capacidade de controlar o desenvolvimento de *Pseudocercospora vitis*. Salienta-se que novos trabalhos sejam realizados com outras formas de extração dos componentes desse cogumelo e que sejam testadas aplicação, em condições *in vivo* com a dose de 10% para que se possa verificar o efeito de controle da mancha-das-folhas em videiras.

CONCLUSÕES

A suspensão miceliada aquosa de *Agaricus brasiliensis* em 10% e apenas autoclavada reduz o crescimento micelial e inibe a esporulação de *Pseudocercospora vitis*.

A adição de antibiótico no meio BDA reduziu o efeito antifúngico da suspensão miceliada aquosa de *Agaricus brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

- AGATA, R.; WŁODZIMIERZ, G. Composition and biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies - a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.67, n.3, p.173-182, 2017.
- BHUSHAN, A.; KULSHRESHTHA, M. The Medicinal Mushroom *Agaricus bisporus*: Review of phytopharmacology and potential role in the treatment of various diseases. **Journal of Nature and Science of Medicine**, v.1, n.4, p.4-9, 2018.
- DALLA SANTA, H.S.; RUBEL, F.; VITOLA, F.; TARARTHUCH, A.L.; LIMA FILHO, J.H.H.; FIGUEREDO, B.C.; DALLA SANTA, O.R.; RAYMUNDO, M.S.; HABU, S.; SOCCOL, C.R. Kidney function indice in mice after long intake of *Agaricus brasiliensis* mycelia (*Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) produced by solid state cultivation. **Online Journal of Biological Sciences**, v.9, n.1, p.21-28, 2009.
- DU, B.; ZHU, F.; XU, B. An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms. **Journal of Functional Foods**, v.47, p.334-342, 2018.
- ESFAHANI, S.S.; EMTIAZI, G.; SHAFIEI, R.; GHORBANI, N.; ESFAHANI, S.H.Z. Tolerance Induction of temperature and starvation with tricalcium phosphate on preservation and sporulation in *Bacillus amyloliquefaciens* detected by flow cytometry. **Current microbiology**, v.73, n.3, p.366-373, 2016.

- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- GARCIA, C.; FARIA, C.M.D.R.; SANTA, H.S.D.; BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J. Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on 'Isabel Precoce'. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.85, p.1-8, 2018.
- HELENO, S.A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; GLAMOCLIJAJ, J.; FERREIRA, I.C. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **LWT-Food Science and Technology**, v.63, n.2, p.799-806, 2015.
- ISHIHARA, A.; GOTO, N.; KIKKAWA, M.; UBE, N.; USHIJIMA, S.; UENO, M.; OSAKI-OKA, K. Identification of antifungal compounds in the spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. **Journal of Pesticide Science**, v.43, n.2, p.108-113, 2018.
- LIANG, C.; JAYAWARDENA, R.S.; ZHANG, W.; WANG, X.; LIU, M.; LIU, L.; LI, X. Identification and characterization of *Pseudocercospora* species causing grapevine leaf spot in China. **Journal of Phytopathology**, v.164, n.2, p.75-85, 2016.
- MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; OLIVEIRA, J.S.B.; JARDINETTI, V.A.; BATISTA, B.N. Rosemary essential oil in the control of diseases and induction of resistance in grapevine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.5, p.330-339, 2014.
- MAIA, A.J.; SHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, J.B.S.; SANTOS, R.C.D. Spore production and effect of temperature and light on germination and infection by *Pseudocercospora vitis* in grape plants. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p. 287-291, 2015.
- OLIARI, I.C.R.; GARCIA, C.; FEDRIGO, K.; MARCHI, T.; MENEGASSI, T.; DALLA SANTA, H.S.; FARIA, C.M.D.R. Suspensão miceliada de *Agaricus brasiliensis* na germinação de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira. **Cadernos de Agroecologia**, v.9, n.1, p.1-5, 2014.
- OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.
- PONS, A.; MOUAKKA, N.; DELIERE, L.; CRACHEREAU, J. C.; DAVIDOU, L.; SAURIS, P.; DARRIET, P. Impact of *Plasmopara viticola* infection of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes on wine composition and flavor. **Food Chemistry**, v.239, p.102-110, 2018.
- RITSCHHEL, P.; MAIA, J.D.; PROTAS, J.F.D.S.; GUERRA, C.C.; PEREIRA, G.E.; LIMA, M.D.S. A viticultura e a agroindústria de suco de uvas americanas em um mercado em crescimento. **Territoires du Vin**, v.9, n.1, p.1-9, 2018.
- RZYMSKI, P.; MLECZEK, M.; SIWULSKI, M.; JASIŃSKA, A.; BUDKA, A.; NIEDZIELSKI, P.; BUDZYŃSKA, S. Multielemental analysis of fruit bodies of three cultivated commercial *Agaricus* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.59, n. 1, p.170-178, 2017.
- SMIDERLE, F.R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M.Z.; IACOMINI, M.; WICHERS, H.J.; VAN GRIENSVEN, L.J. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v.94, n.1, p.91-99, 2013.
- SOUZA, N.B.; CONTESSA, C.R.; ALMEIDA, L.; MANERA, A.P.; MORAES, C.C. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato purificado do cogumelo *Agaricus blazei* cultivado por fermentação em estado sólido. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v.2, n.1, p.1-7, 2016.
- STAJIC, M.; CILERDZIC, J.; VUKOJEVIC, J. Mushrooms as potent sources of new biofungicides. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.18, n.13, p.1055-1066, 2017.
- STANGARLIN, J.R.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.