

AValiação DO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides*, in vitro, POR MEIO DO USO DE EXTRATOS VEGETAIS.

Kamila Freire Araujo SANTANA¹; Cleci DEZORDI²; Rosalee Albuquerque COELHO NETTO³; Rogério Eiji HANADA⁴.

¹bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador e bolsista PCI/NCT/INPA; ³Co-orientador CPCA/INPA; ⁴ Colaborador CPPF/INPA.

1. Introdução

Uma das mais freqüentes doenças da cultura da cebolinha no Brasil é a antracnose, que é causada pelo fungo chamado de *Colletotrichum gloeosporioides*, este patógeno provoca uma lesão circular, deprimida com margem marrom clara (Resende e Fancelli, 1997). Esta doença está disseminada por todo o mundo, mas é mais severa nas regiões tropicais e subtropicais, onde é comum e prejudicial na maioria das áreas de produção. A antracnose foliar pode diminuir a qualidade ou provocar perdas de até 100% da produção (Costa e Mello, 1984). Para o controle da doença é mais utilizado tratamento químico com fungicidas, destacando-se aqueles à base de benomyl e tiofanato metílico. Pois reduz a quantidade de inóculo no campo. Porém há restrição do uso de fungicidas devido à fitotoxicidade, efeitos residuais e resistência pelo patógeno, têm levado a procura de métodos alternativos de controle, tais como, o uso de biofungicidas, entre eles, os extratos vegetais (Benato *et al.*, 2002). Na literatura existem vários estudos que obtiveram resultados positivos com utilização dos extratos vegetais, dentre eles estão àqueles realizados por Rodrigues *et al.* (2007), que avaliou o controle de *S. sclerotiorum* em alface utilizando EBA (extrato bruto aquoso) de gengibre; Kuhn *et al.* (2006), que estudou o efeito de *Curcuma longa* sobre *Xanthomonas* sp. em mandioca, entre outros. Contudo o objetivo deste trabalho foi estudar extratos vegetais com potencial utilização no controle alternativo do *C. gloeosporioides*, *in vitro*, para avaliar a atividade do potencial fungitóxico ou fitotóxico a este fungo.

2. Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia/ CPCA/ INPA, em Manaus-AM, entre os meses de Agosto de 2009 a Fevereiro de 2010. Plantas de cebolinha com sintomas semelhantes à antracnose foram coletadas no município de Manacapuru-AM. Estas foram transportadas para o Laboratório de Fitopatologia onde foram avaliados sob microscópio e isoladas estruturas de um fungo parecido com *Colletotrichum gloeosporioides*, para confirmar a etiologia dos sintomas foram realizados o Postulado de Kock em plantas de cebolinha. Para tal, plantas de cebolinhas foram feridas ou não, em seguida, inoculadas por meio de aspersão, com suspensão de esporos, na concentração 5×10^4 conídios/ mL. As plantas foram submetidas à câmara úmida durante 24h. Os sintomas foram avaliados após sete dias. Então se procedeu, novamente, o isolamento do fungo, onde foram comparadas as estruturas com o isolamento de Manacapuru. Após a confirmação, o fungo foi cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 25°C e fotoperíodo de 12h, em luz UV. Para a elaboração do extrato bruto aquoso (EBA) foram selecionadas cinco espécies de plantas para serem utilizadas nos tratamentos, elas são: crajiru (*Arrabidaea chica*), pimenta longa (*Piper aduncum* L.), caapeba (*Pothomorphe umbellata*), nim (*Azadirachta indica*) e cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*). Todas as plantas foram trituradas em moinho. Quando frescas foram desidratadas em estufa a 72°C, antes de serem trituradas, para obter fragmentos pequenos dos diferentes vegetais. Estes foram armazenados em recipientes fechados. Para a produção dos EBAs foi misturado 200 g de vegetal/800 mL de água, que permaneceram durante 24h armazenados na geladeira. Após foi realizada a filtração em coador comum. Em seguida, o extrato foi filtrado, novamente, por meio de gaze para reter restos de partículas sólidas. Obtendo extrato líquido na concentração de 20%. Os EBAs foram esterilizados por dois diferentes métodos: (1) por meio da filtração onde foi utilizado "Kit filtração", com membranas Millipore de 0,45 µm e, posteriormente, de 0,22 µm; (2) por meio da autoclavagem onde foram submetidos a uma temperatura de 120°C e um atm, por 15 min. Após o processo de esterilização os EBAs foram devidamente lacrados, consecutivamente armazenados em geladeira, até a realização do experimento. Os tratamentos utilizados foram constituídos de aplicação de EBAs autoclavado e/ou filtrado em cinco diferentes concentrações: 20; 10; 7,5; 5 e 2,5%. Foi utilizado controle com meio BDA sem EBA. Para

diluição dos extratos foi utilizada água estéril. Todos os extratos diluídos foram, homogeneizados em suas devidas concentrações no BDA, após autoclavagem ou não e sob temperatura fundente. Onde foram vertidos para placas Petri. Foi transferido para o centro de cada placa Petri previamente vertida, um disco de cinco milímetros de diâmetro de cultura do fungo *C. gloeosporioides* (colônia com 15 dias de crescimento), estas foram vedadas com filme plástico e mantidas incubando a 25°C, sob fotoperíodo de 12h, em luz UV. As avaliações iniciaram 48h após a repicagem e consistiram de medições diametralmente opostas do crescimento das colônias de *C. gloeosporioides*. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada dosagem em relação à testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído por dois métodos de esterilização, seis extratos vegetais, seis concentrações e quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

3. Resultados e discussão

As manchas circulares e concêntricas encontradas em folhas de cebolinha foram diagnosticadas por meio do Postulado de Kock como sendo causadas pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Este resultado está de acordo com os encontrados por Wordell Filho *et al.* (2008), em que afirmam que este patógeno pode causar a doença da antracnose em *Allium cepa* L., podendo provocar perdas de até 100% da produção. No experimento de inibição de crescimento de colônia *in vitro*, pode-se notar que os diferentes métodos de esterilização utilizados afetaram de forma distinta a integridade dos extratos vegetais. Verificou-se que os extratos de nim, cajuru e pimenta longa inibiram mais o crescimento das colônias de *C. gloeosporioides* quando submetidos ao processo de esterilização por filtração do que quando foram autoclavados. Já os extratos de caapeba e cravo não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao crescimento de colônia nos diferentes processos. Este comportamento pode ser um forte indício de que as substâncias contidas nos extratos vegetais de nim, cajuru e pimenta longa são termolábeis e, portanto, perdem compostos importantes para o controle de *C. gloeosporioides* se forem submetidos a temperaturas elevadas. Estes resultados concordaram com Franzener *et al.* (2003), os quais observaram que extratos de cânfora (*Artemisia camphorata*) não apresentaram resultados semelhantes quando autoclavados em relação ao extrato filtrado da mesma. Foi observado que o extrato de cravo apresentou controle de 15,1% do crescimento deste fungo quando filtrado e 8,7% quando autoclavado. Estes resultados estão de acordo com Reis *et al.* (2009), em que haviam verificado a existência de efeito antimicrobiano do cravo em seus estudos envolvendo testes *in vitro* e extrato de cravo da Índia para inibir o crescimento de *Phomopsis* sp. e de *Cercospora kikuchii*. Foi observado que em todas as concentrações testadas houve inibição do crescimento de colônia, sendo que na maior concentração, ou seja, a de 20% foi a que apresentou mais controle do fungo, em relação à testemunha. Contudo, é possível dizer que o cravo contém propriedades fungitóxicas e ou fitotóxicas. O extrato de cajuru apresentou controle de 9,1% do crescimento de colônias do *C. gloeosporioides* em relação à testemunha. Conforme Santana *et al.* (2009), o cajuru possui propriedades antimicrobianas que podem inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, tais como: *Sclerotium rolfsii* no tomateiro que foi inibido em 66,2% em relação à testemunha, por meio de EBA de cajuru na concentração de 20%. A pimenta longa apresentou controle de 7,8% da colônia de *C. gloeosporioides*, em sua maior concentração. Concordando com Bastos *et al.* (2004), a pimenta longa apresenta potencial de uso para o controle da podridão de frutos de banana causada por *Colletotrichum musae* em pós-colheita. O EBA de caapeba não apresentou nenhum controle do *C. gloeosporioides*, em relação à testemunha. Nem quando esterilizado por filtração nem por autoclavagem. Porém Santana *et al.* (2009), observou que o EBA de caapeba obteve inibição de 55,4% em tomateiro em relação à testemunha controle, ou seja, a que foi inoculada com o patógeno. Por tanto, a caapeba não possui compostos fitotóxicos e ou fungitóxico contra o *C. gloeosporioides* por meio do extrato aquoso. O nim não apresentou controle do *C. gloeosporioides*, em relação à testemunha. De acordo com Marques *et al.* (2004), verificou que o óleo de nim afeta o crescimento e a esporulação de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. farinosus*, mas não afeta a viabilidade dos conídios destes fungos. De acordo com os resultados referentes ao efeito dos diferentes extratos vegetais na inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, observa-se que houve baixa inibição do crescimento das colônias nas respectivas concentrações testadas, de acordo com a **Tabela 1**. No entanto, é importante ressaltar que a existência de potencial antimicrobiano em compostos vegetais é de suma importância, uma vez que, estes podem ser isolados ou mais concentrados e então produzir mais inibição fúngica.

Tabela 1. Efeito de diferentes EBAs sobre o crescimento de colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, sob distintas concentrações.

Concentração	Autoclavagem	Filtragem	Média
-----caapeba-----			
0	3,02a	2,99a	3,01
2,5	2,88a	2,81a	2,85
5	3,06a	3,00a	3,03
7,5	2,84a	2,78a	2,81
10	2,80a	2,66a	2,73
20	2,71a	2,65a	2,68
Média	2,89	2,82	2,85B
-----pimentá longa-----			
0	2,79a	2,69a	2,74
2,5	2,83a	2,52b	2,68
5	2,82a	2,71a	2,77
7,5	2,79a	2,48b	2,64
10	2,80a	2,36b	2,58
20	2,83a	2,35b	2,59
Média	2,81	2,52	2,66C
-----crajiru-----			
0	3,23a	2,88b	3,06
2,5	3,24a	2,60b	2,92
5	3,21a	1,93b	2,57
7,5	3,27a	2,76b	3,02
10	3,26a	2,94b	3,10
20	3,23a	2,83b	3,03
Média	3,24	2,66	2,95A
-----cravo-----			
0	2,47a	2,6a	2,54
2,5	2,47a	2,31a	2,39
5	2,50a	2,38a	2,44
7,5	2,28a	2,27a	2,28
10	2,14a	2,27a	2,21
20	1,86a	1,79a	1,83
Média	2,29	2,27	2,28D
-----nim-----			
0	3,08a	2,90b	2,99
2,5	3,08a	2,83b	2,96
5	3,13a	3,00a	3,07
7,5	3,10a	2,85b	2,98
10	3,05a	2,70b	2,88
20	3,01a	2,71b	2,86
Média	3,08	2,83	2,95A

*Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P d <0,05).

4. Conclusão

Estes resultados indicam o potencial do cravo da índia para o controle de *C. gloeosporioides* em cebolinha, o qual pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa. Entretanto estudos adicionais devem ser conduzidos visando evidenciar estas possibilidades para futuramente poder controlar a mancha provocada pelo *Colletotrichum* na cebolinha em cultivos agroecológicos.

5. Referências

- BENATO, E.A.; SIGRIS, J.M.M.; HANASHIRO, M.M.; MAGALHÃES, M.J.M.; BINOTTI, C.S. 2002. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. *Summa Phytopathologica*, 28: 299-304.
- BASTOS C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. 2004. Efeito do óleo de Piper aduncum no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatol. brás.* 29(5): set-out.
- COSTA, C.P. da, MELLO, I.S. 1984. Progresso obtido com dois ciclos de seleção massal em cebola visando resistência à *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Horticultura Brasileira*, v.2, p.21-23.
- FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A.S.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. 2003. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemísia camphorata*. *Acta Scientiarum*. 25(2):503-7.
- KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; DEL ÁGUILA, R.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. 2006. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Semana: Ciências Agrárias, Londrina*, 27(1): 13-20.
- REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, cap.46, p.261-297, 1997.
- RODREIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. 2007. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, 33(2):124-128.
- SANTANA, K.F.A.; DEZORDI, C.; COELHO NETTO, R.A.; HANADA, R.E. 2009. Avaliação do controle da podridão de *Sclerotium folfisi* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), por meio do uso de extratos de planta. XVIII Jornada de iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA, 17: 67-69.
- WORDELL FILHO, J.A.; STADNIK, M.J. 2008. Avaliação da reação variável de cebola à antracnose foliar. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, 34(3),284-286.