

Efeito alelopático de extratos vegetais sobre a germinação de esporos de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*

PINTOR, I. R.¹; SILVA, J. A.²; DIAS, L. A. F.²; LOPES, I. DE O. N.,³; SEIXAS, C.D.S.³; ALMEIDA, A. M. R.³.

¹UNOPAR, bolsista Pibic/CNPq; ²Estagiário, Embrapa Soja;

³Pesquisador, Embrapa Soja, alvaro.almeida@embrapa.br

Introdução

O uso de produtos biológicos com efeitos alelopáticos (fungicidas ou fungistáticos) pode ser uma opção viável na redução do impacto da agricultura sobre o ambiente. Normalmente, o controle de doenças causadas por fungos é realizado com fungicidas sintéticos, que além de possuírem custos elevados, ainda podem causar problemas ao ambiente por causa das substâncias tóxicas presentes em sua formulação. Uma alternativa para o controle dessas doenças é a utilização de plantas que são capazes de sintetizar substâncias antifúngicas (SILVA et al. 2008).

Molish (1937) definiu o termo alelopatia utilizando as palavras gregas *allelon* e *pathos*, que representa mútuo e prejuízo, respectivamente. O

termo foi atribuído para indicar as relações entre as plantas, incluindo microrganismos, que são provocadas quando ocorre a liberação de substâncias químicas em tecidos vivos ou mortos. Alelopatia não se refere a uma competição, uma vez que competição se baseia na disputa de recursos limitados em um ambiente, e sim em um processo onde produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados e isso influenciará na germinação ou no desenvolvimento de outras plantas (SEVERINO, 2006). Além de influenciar no desenvolvimento de outras plantas, pesquisas realizadas vêm mostrando que muitos patógenos podem ser controlados utilizando extratos vegetais (CELOTO et al., 2008), em razão das substâncias alelopáticas presentes em cada um dos extratos.

O fungo *Colletotrichum truncatum* é causador de uma importante doença da soja nos Cerrados brasileiros, denominada antracnose. Ambientes de alta umidade e altas temperaturas favorecem seu desenvolvimento, causando abertura e apodrecimento das vagens da soja, apodrecimento das sementes, morte prematura das vagens e germinação dos grãos em formação (YORINORI et al., 1993). Nessa fase o fungo já começa a ser visível por pontuações negras na planta que são as suas frutificações (ALMEIDA et al., 2005).

O fungo *Corynespora cassiicola* foi identificado pela primeira vez no Brasil em Tatumã-SP causando necroses foliares em soja (ALMEIDA et al., 1976). Esse fitopatógeno infecta folhas, flores, frutos, raízes e caules. Possui ampla gama de hospedeiros em diversos países tropicais e subtropicais (SILVA et al., 1995). Segundo Blazquez (1991), a doença se torna mais severa quando não há ocorrência de períodos secos prolongados, prevalecendo em regiões chuvosas.

Nas áreas de cultivo de soja ocorrem plantas daninhas que podem ter efeito sobre a cultura. Nessas mesmas áreas outras culturas também são implementadas, em sucessão a soja (trigo, aveia, milho, sorgo).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito alelopático dos extratos de plantas presentes no sistema de produção de soja: aveia

(*Avena sativa*), buva (*Conyza spp.*), capim-amargoso (*Digitaria insularis*), corda-de-viola (*Ipomoea spp.*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e trapoeraba (*Commelina bengalensis*) sobre a germinação dos esporos dos fungos *C. truncatum* e *C. cassicola*.

Material e Métodos

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, em Londrina, PR.

Obtenção dos extratos

As amostras de aveia, buva, capim-amargoso, corda-de-viola, milho, sorgo e trapoeraba foram coletadas no campo experimental da Embrapa Soja, acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o laboratório.

As folhas foram separadas das hastes, colocadas em uma bandeja, e deixadas na estufa por 12h a 40 °C com ventilação forçada. Após esse período, 5 g de tecido seco foram pesados e os fragmentos foram acondicionados em frascos com tampa. Foram adicionados 100 mL de água destilada em cada um dos frascos e os mesmos foram levados ao forno de micro-ondas com a tampa semiaberta até iniciar fervura, por 1min 20s aproximadamente para esterilização. Os vidros foram deixados em temperatura ambiente por cerca de 10 a 15 dias para fermentação. As soluções fermentadas foram filtradas em gaze dupla e uma alíquota do filtrado foi colocado em tubo eppendorf de 2 mL e submetidos centrifugação a 7.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi colocado em novos tubos eppendorf, que foram identificados e armazenados em câmara fria com temperatura aproximada de 12 °C.

Obtenção dos isolados fúngicos

O isolado de *C. truncatum* foi obtido de plantas de soja coletadas na Embrapa Soja em Londrina, PR e o isolado de *C. cassicola* foi obtido da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja, identificado como CMES 928R.

Os isolados foram repicados para placas com meio BDA (batata – dextrose – ágar) e cultivados a 28 °C durante 12 dias.

Experimento

Os efeitos dos extratos na germinação dos esporos de ambas as espécies fúngicas foram avaliados com fermentado bruto e fermentado nas diluições de 1:10 e 1:20, em experimentos independentes. Cada experimento foi executado em blocos casualizados completos, em que cada bloco era constituído por uma câmara úmida mantida em temperatura ambiente (25 °C), sem incidência de luz direta, contendo oito lâminas com a suspensão de esporos de um fungo e extrato (sete extratos + controle). Isso foi repetido três vezes para fermentado bruto e para as diluições. A suspensão de esporos dos fungos foi preparada adicionando-se 5 mL de água destilada na placa de Petri, contendo o isolado do fungo previamente cultivado (12 dias). Para que os conídios se soltassem foi realizado um leve pincelamento. Em seguida, alíquotas de 10 μL daquela suspensão foram dispostas em três áreas circulares independentes, marcadas por lápis de cera. Em cada área era adicionado 20 μL de extrato e essa mistura era succionada e liberada por três vezes, para garantir a homogeneidade. A lâmina controle foi preparada de modo semelhante, porém utilizando apenas água destilada como solvente.

Após a preparação de cada bloco, o mesmo era mantido fechado por cinco horas. Após esse período, a leitura das lâminas foi realizada por fotografias de três pontos independentes em cada área circular, obtidas por microscópio óptico, utilizando-se lente objetiva de 10x. Foi considerado germinado o conídio que apresentasse tubo germinativo com comprimento que fosse o dobro do diâmetro do conídio ou que apresentasse apressório.

Análise estatística

Foram realizadas análise de variância (ANOVA) da porcentagem de esporos germinados em cada experimento, considerando-se que a contagem de germinação média de cada lâmina era uma repetição simples. Foram realizadas análises de variâncias nos dados originais e nos dados transformados, segundo Box e Cox (1964). Em todos os casos, foram realizados os testes de normalidade, aditividade e homogeneidade de variâncias para verificar a adequação dos dados ao modelo anova. A

independência dos resíduos foi verificada graficamente. Em todos os experimentos, o modelo utilizado foi mais apropriado para descrever a variabilidade na germinação dos esporos nos diferentes tratamentos e estes são os resultados apresentados nesse trabalho. Para a comparação entre as germinações médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey adotando-se o nível de significância $p=0,05$. Para as análises estatísticas, foram desenvolvidos rotinas computacionais no ambiente SAS®, versão 9.3 (SAS/ STAT®, 1999). As transformações foram realizadas utilizando-se a macro boxglm, desenvolvida por Michael Friendly e disponível para download no link <<http://www.datavis.ca/sasmac/boxglm.html>> .

Resultados e Discussão

Os fungos apresentaram comportamentos diferentes quando expostos aos fermentados (Tabela 1). Houve inibição de germinação de esporos de *Colletotrichum truncatum* apenas quando foi utilizado fermentado bruto. Os extratos que apresentaram efeito inibidor sobre a germinação dos esporos foram os extratos de aveia, corda-de-viola, milho e sorgo.

Ao utilizar os fermentados nas diluições de 1:10 e 1:20 foi verificado que os esporos apresentaram tubos germinativos ou formação de apressórios, mostrando que não houve interferência na germinação dos conídios (Figura 1).

O fungo *C. cassiicola* apresentou diferença nos tratamentos somente quando o fermentado não estava diluído. Os extratos de aveia e milho apresentaram efeito inibidor sobre a germinação dos esporos. Nas diluições de 1:10 e 1:20 não houve interferência significativa dos extratos na germinação. Quando o extrato não interferiu no desenvolvimento do fungo, a germinação de *C. cassiicola* ocorreu normalmente (Figura 2).

A presença de substâncias (fungicidas ou fungistáticas) nos extratos das espécies de plantas utilizadas, devem ser melhor estudadas para que seja possível determinar os compostos inibidores presentes, e avaliar as doses dos extratos e também observar sua atividade em condições de campo e a toxicidade que pode causar ao ambiente e ao

homem (CELOTO et al., 2008).

Conclusão

Os fermentados brutos de aveia, corda-de-viola, milho e sorgo podem controlar a germinação de *C. truncatum*. Na germinação dos esporos de *C. cassiicola*, somente os fermentados brutos de aveia e de milho apresentaram ação inibidora.

Referências

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A. M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.569-588.

ALMEIDA, A.M.R.; MACHADO, C.C.; FERREIRA, L.P.; LEHMAN, O.S.; ANTONIO, H. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p.111-112, 1976.

BLAZQUEZ, C. H. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. 23p.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)**, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, v. 30, n.1, p. 1-5, 2008.

MOLISCH, H. **The influence of one plant on another: allelopathy**. Jodhpur, India: Scientific Publishers, 1937. 155p.

SAS/STAT®. **Versão 9.1.3 do sistema SAS para Windows. 1999-2001.**
Cary: SAS Institute Inc., 1999.

SEVERINO, L. S.; LIMA, R. L. S; ALBUQUERQUE, R. C.; BELTRÃO, N. E. M. Alelopatia de plantas daninhas sobre mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Cenário atual e perspectivas: anais.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.

SILVA, M.B.; NICOLI, A. COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B.G.; JAMAL, C.M., SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.3, p.57- 60, 2008.

SILVA, W. P. K., MULTANI, D. S., DEVERALL, B. J., LYON, B. R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, v. 43, p. 609-618, 1995.

YORINORI, J. T.; CHARCHAR, M. J. A.; NASSER, L. C. B.; HENNING, A. A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. (ed.). **Cultura da soja nos Cerrados.** Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 337-397.



Figura 1. Conídios de *Colletotrichum truncatum* com apressório e tubo germinativo.



Figura 2. Conídio de *Corynespora cassiicola* germinado.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de esporos de *C. truncatum* e *C. cassiicola* expostos ao fermentado bruto.

Tratamento	<i>C. truncatum</i>	<i>C. cassiicola</i>
Aveia	0,2 b	0,0 c
Buva	40,9 a	63,0 a
Capim-amargoso	30,0 a	36,8 ab
Corda-de-viola	0,3 b	8,1 bc
Milho	0,0 b	0,2 c
Sorgo	0,0 b	20,11 ab
Trapoeiraba	52,3 a	63,5 a
Controle	69,9 a	57,4 ab

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).