



INIBIÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. ISOLADO DO MORANGUEIRO COM O USO DE EXTRATOS OBTIDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Maria Inês Diel^I Victor Hugo Casa-Coila^{II}

^IMestranda em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Frederico Westphalen. E-mail: mariaines.diel@hotmail.com.

^{II} Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. Brasil. E-mail: torcasa7@yahoo.com.br

Recebido em: 16/11/2015 – Aprovado em: 10/12/2015 – Publicado em: 21/12/2015
DOI: http://dx.doi.org/10.18677/Agrarian_Academy_016

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de resíduos agroindustriais de manipueira, bagaço da cana-de-açúcar e albedo de citros na inibição do crescimento micelial *in vitro* de dois isolados do fungo *Colletotrichum* spp. Os resíduos foram obtidos de agroindústrias da região Noroeste do Rio Grande do Sul. E os isolados utilizados foram coletados do morangueiro. Para a diferenciação dos isolados foram realizados testes de patogenicidade, e diferenças morfológicas de colônia entre os isolados do patógeno. Os extratos dos resíduos foram preparados a 20% (Extrato Bruto) e diluídos em concentrações de 0, 5, 10, 15, 20%, exceto para a manipueira que foi diluída pura nas concentrações citadas mais a dose de 75%. Os extratos foram filtrados em filtro Milipore 0,22 µm, e misturados em meio BDA. Sobre o meio de cultura com as concentrações correspondentes do extrato foi depositado um disco de meio contendo o patógeno e estas foram mantidas a 22°C com fotoperíodo de 12 horas luz. A avaliação foi realizada aos sete dias. A média das medidas do diâmetro da colônia dos isolados foram submetidas a análise de regressão. Os resultados permitem verificar que o resíduo de manipueira, bagaço de cana-de-açúcar e o albedo de citros apresentaram efeito inibitório do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* sp., apresentando efeito positivo, pois a medida que é incrementado a concentração dos extratos é incrementado a inibição do crescimento micelial.

PALAVRAS-CHAVE: Antracnose. Patogenicidade. Controle alternativo.

IN VITRO INHIBITION OF MYCELIAL GROWTH OF *Colletotrichum* spp. ISOLATED FROM STRAWBERRY USING EXTRACTS OBTAINED FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTE

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of agro-industrial waste cassava, bagasse from sugarcane and citrus albedo in the inhibition of mycelial growth *in vitro* of two isolates of *Colletotrichum* spp. The residues were obtained from the agribusiness Northwest Rio Grande do Sul region. And the isolates used were collected from strawberry. For differentiation of isolates pathogenicity tests were

performed, and colony morphological differences among isolates of the pathogen. The residues of the extracts were prepared 20% (Crude extract) and diluted at concentrations of 0, 5, 10, 15, 20%, except for cassava which has been diluted in pure mentioned concentrations over the 75% dose. The extracts were filtered through Millipore filter 0.22 μ M, and mixed on PDA. About culture medium with corresponding concentrations of the extract was deposited a means disc containing the pathogen and these were maintained at 22 ° C with a photoperiod of 12 hours light. The evaluation was performed seven days. The average of the measurements of the diameter of the colony isolates were subjected to regression analysis. The results, show that the residue of cassava, bagasse from sugarcane and citrus albedo showed inhibitory effect of mycelial growth of *Colletotrichum* sp., With positive effect, because as it is increased the concentration of the extracts is incremented the inhibition of mycelial growth.

KEYWORDS: Anthracnose. Alternative control.

INTRODUÇÃO

A agricultura convencional utiliza quantidades elevadas de agrotóxicos em todos os seus sistemas de produção, fato este que acarreta, na maioria das vezes, danos à saúde humana em consequência do consumo de alimentos e água com resíduos desses produtos (HENZ, 2010). Outro problema é o surgimento de populações de patógenos com resistência aos princípios ativos utilizados, devido ao uso contínuo destes produtos e aos erros de aplicação de fungicidas, além de causar problemas ambientais (FILHO, 2003).

Entre as culturas com maior número de aplicações de fungicidas encontra-se o morangueiro (HENZ, 2010). Sendo que esta cultura é de grande importância, principalmente nas pequenas propriedades familiares. Durante o ciclo de produção, esta cultura é afetada por diversos fatores de ordem abióticos, como temperatura, radiação, vento, chuva além de fatores bióticos, os quais possuem interferência de patógenos como fungos, vírus, bactérias, insetos, nematoides, entre outros (UENO, 2004).

Os fatores abióticos podem ser controlados pela escolha do sistema de produção, e estes variam desde baixo nível tecnológico considerando aqueles onde a produção é manejada em canteiros, sem cobertura de solo e sem cobertura plástica para o controle de ventos, geadas e chuvas, até aqueles onde é adotado alto nível tecnológico sendo a nutrição realizada por fertirrigação e há a presença de estufas para o controle, principalmente, de fatores ambientais (MACKENZIE et al., 2006).

Dentre os fatores bióticos encontram-se as doenças fúngicas, que ocasionam perdas de produção no morangueiro com destaque para a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. Várias espécies de *Colletotrichum*, principalmente *C. acutatum* e *C. fragariae*, infectam os frutos, rizoma e flores (MACKENZIE et al., 2006).

O *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose ou flor-preta do morangueiro é prejudicial para esta cultura pois causa a morte dos botões florais e flores abertas, podridão dos frutos e encontra-se distribuída em todos os países produtores de morango além de ser hospedeiro em mais de 15 famílias de plantas (AGROFIT, 2014).

Entre as medidas de controle encontram-se o controle genético, cultural e químico. São poucas as variedades resistentes, disponíveis, e ainda, a diversidade de raças do fungo pode fazer com que a variedade seja resistente numa localidade e

suscetível em outra devido a quebra de resistência do material genético por distintas raças do patógeno (HENZ, 2010). Com relação ao controle cultural, as práticas mais utilizadas são produção de mudas *in vitro*, evitar a irrigação por aspersão, cobertura do solo com palhada (AGROFIT, 2014).

Para que o controle de doenças seja eficaz, faz-se necessário a adoção de medidas de controle dentro de um sistema de manejo integrado de doenças, envolvendo vários métodos de controle, com vistas a garantir o sucesso sem maiores danos às culturas. Para adotar medidas de manejo integrado deve-se ter conhecimento da cultura e também do patógeno, bem como o ciclo de vida (UENO, 2004).

Além do controle genético, biológico, cultural e químico, o controle alternativo através do uso de extratos vegetais vem ganhando destaque (BENATO & CIA, 2009). Assim, uma alternativa é o uso de extratos provenientes de resíduos agroindustriais, pois estes são gerados em grandes quantidades e, na maioria das vezes não possuem destinação correta e acabam contaminando o meio ambiente, tornando-se um passivo ambiental.

Com base nas premissas do controle alternativo de doenças em plantas, que vem ganhando espaço na agricultura de base ecológica, bem como a geração de grandes quantidades de resíduos agroindustriais, esta pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito dos resíduos de manipueira, bagaço da cana-de-açúcar e albedo de citros na inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo *Colletotrichum* sp. isolado do morangueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com dois isolados do fungo *Colletotrichum* spp. O primeiro isolado foi coletado da cultura de morango no município de Arroio do Padre, Rio Grande do Sul (RS) durante o ano de 2013 e faz parte da micoteca da Embrapa Clima Temperado, e o segundo isolado foi proveniente da cidade de Tunas, RS, coletado no inverno de 2014 a partir do caule de morangueiro infectado. Foram realizados explantes do material, em condições assépticas e acondicionadas em placas de Petri em meio batata – dextrose - ágar (BDA). Após as placas foram acondicionadas em temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h luz para o desenvolvimento do fungo. Posteriormente o isolado coletado durante o período 2014 foi purificado através do isolamento monospórico. Já o isolado da coleção encontrava-se purificado.

Os resíduos agroindustriais utilizados foram adquiridos diretamente da agroindústria. A seguir obteve-se o extrato bruto a 20% e estas foram filtrados em filtro de papel milipore com 22 μm de espessura, através do emprego da bomba de vácuo e o extrato obtido foi armazenado em geladeira (5°C) até o uso.

Foram preparados extratos nas concentrações dos extratos 5, 10, 15 e 20 % adicionadas a 100 mL de meio de cultura BDA fundente. O extrato de manipueira a qual foi diluída pura nas concentrações citadas testou-se também a concentração a 75%. Posteriormente, uma alíquota de 20 mL de meio contendo cada concentração foi vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após solidificação do meio na placa, foi depositado na superfície deste um disco de 5 mm de diâmetro de meio contendo o micélio do patógeno. Como testemunha foram utilizadas placas contendo apenas o meio BDA com o fungo. Finalmente as placas foram mantidas a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12h luz.

Passados sete dias da instalação do experimento, a avaliação da inibição micelial foi realizada por meio da medição do diâmetro de crescimento micelial do

fungo, realizando-se duas medidas perpendiculares por cada placa avaliada. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 5, sendo três tipos de resíduos agroindustriais e quatro concentrações além da testemunha. Cada tratamento foi constituído de placas contendo o patógeno e os extratos nas diferentes concentrações, com quatro repetições.

A significância dos efeitos dos tratamentos foi determinada por meio do Teste F, sendo as médias dos níveis “extrato” comparadas pelo Teste T e para os níveis “concentração” foram ajustadas regressões polinomiais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da inibição de crescimento micelial, para o isolado de *Colletotrichum* spp., coletado em Arroio do Padre houve interação significativa entre extratos e concentração (Tabela 1).

TABELA 1: Análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos de manipueira, bagaço de cana-de-açúcar sobre o isolado 1 de *Colletotrichum* sp.

Variável	SQ	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Extrato	0,247*	2	0,124	1,580	0,217
Concentrações	2,330	4	0,583	7,450	0,000
Extrato*Concentrações	1,880	8	0,235	3,013	0,009
Erro	3,510	45	0,078		
Total	7,980	59			

* $R^2 = 0,559$

Para o isolado coletado em Tunas, os extratos de manipueira, bagaço de cana de cana-de-açúcar e albedo de citrus, não apresentaram interação significativa (Tabela 2).

TABELA 2: Análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos de manipueira, bagaço de cana-de-açúcar sobre o isolado 2 de *Colletotrichum* sp.

Variável	SG	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Extrato	0,170*	2	0,850	2,006	0,146
Concentrações	8,360	4	2,090	49,420	0,000
Extrato*Concentrações	1,880	8	0,017	0,406	0,911
Erro	1,900	45	0,042		
Total	10,570	59			

* $R^2 = 0,820$

Entre as concentrações testadas, quando os dados foram submetidos à análise de regressão apresentaram modelos significativos, verificou-se efeito de doses na inibição micelial, para o isolado 1 a análise de regressão do efeito dos três extratos ajusta-se ao modelo linear, já para o isolado 2 a regressão ajustou-se ao modelo quadrático (Figura 1).

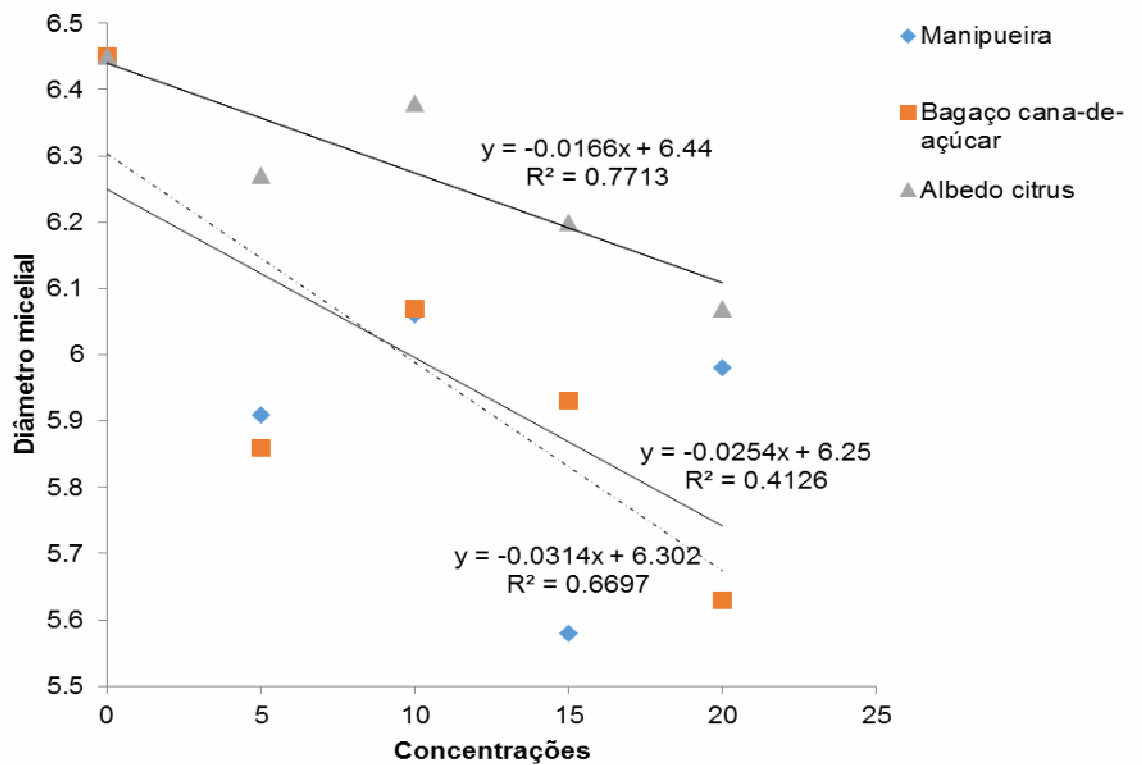


FIGURA 1: Efeito de diferentes concentrações de manipueira e de extratos de bagaço da cana de açúcar e do albedo dos citros sobre o diâmetro micelial do isolado 1 do fungo *Colletotrichum* sp.

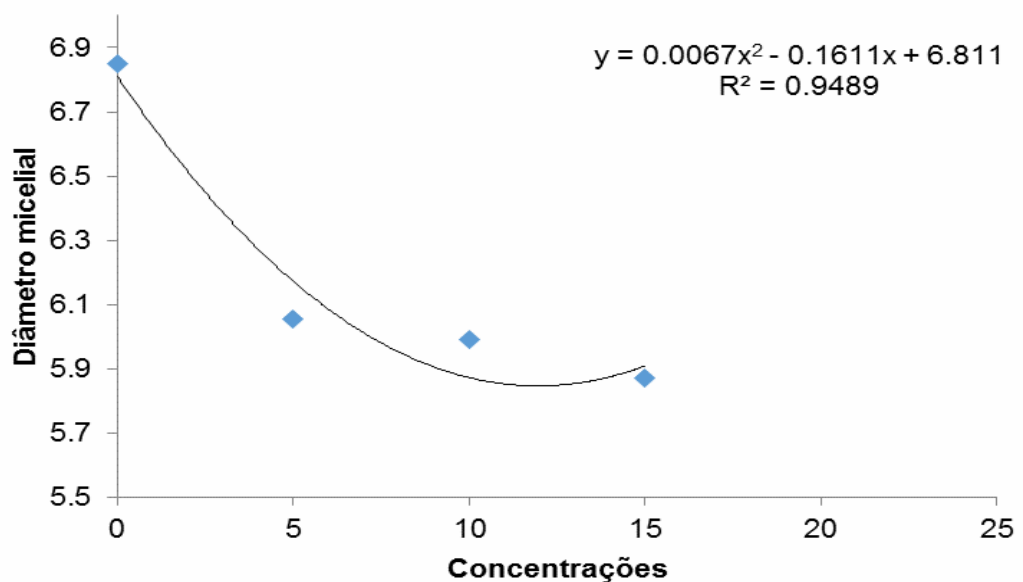


FIGURA 2: Efeito de diferentes concentrações de manipueira e de extratos de bagaço da cana de açúcar e do albedo dos citros sobre o diâmetro micelial do isolado 2 do fungo *Colletotrichum* sp.

Em ambos os isolados, existe um efeito positivo, pois quando se aumenta a concentração dos extratos, aumenta a inibição do crescimento micelial. Portanto, o uso de extratos a maiores concentrações possibilita um maior controle do patógeno.

Nos testes *in vitro* foi verificando o efeito de diferentes concentrações sobre cada isolado de *Colletotrichum* spp. Na concentração de 75% do extrato de manipueira houve redução significativa do crescimento micelial comparado com a testemunha, tendo uma redução de 36,89 % e 37,22 do crescimento micelial nos isolados 1 e 2 respectivamente (Tabela 3 e Tabela 4).

TABELA 3: Crescimento micelial do isolado 1 de *Colletotrichum* sp. quando submetido a concentração de 75% de manipueira em relação a testemunha (0%).

Dose	Diâmetro	
0%	6,75	a*
75%	4,26	b
C.V (%)	15,96	

*Média seguida da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste T a 5% de probabilidade.

TABELA 4: Crescimento micelial do isolado 2 de *Colletotrichum* sp. quando submetido a concentração de 75% de manipueira em relação a testemunha (0%).

Dose	Diâmetro	
0%	6,53	a*
75%	4,13	b
C.V (%)	13,65	

*Média seguida da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste T a 5% de probabilidade.

O extrato de manipueira possui maior efeito inibitório do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em ambos os isolados, pois à medida que é incrementado a concentração no meio de cultura o diâmetro micelial do fungo é diminuído. Resultados positivos do efeito de manipueira no controle de pragas foram encontrados por SILVA et al. (2011), onde, ao aplicar as maiores concentrações de manipueira, com máximo de 50%, contabilizaram menor quantidade de folhas atacadas pelo ácaro branco em plantas de pinhão manso, em condições de campo.

Os resultados com uso de extratos de resíduos vegetais encontrados nesta pesquisa são confirmados por ROZWALKA et al., (2008), que ao estudarem outro tipo de extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de goiaba, encontraram que o extrato aquoso e o óleo essencial de Cravo-da-Índia inibiram em 100% o crescimento desses patógenos, mostrando a existência de compostos biologicamente ativos nestes extratos, sendo uma alternativa no controle destes patógenos.

O extrato de manipueira, o qual apresentou efeito inibidor sobre o fungo *Colletotrichum* spp. já foi relatado como sendo eficiente sobre o oídio na ceriguela ao ser utilizado puro e, em diluição 1:1 ou em 50% promovendo a paralização do crescimento do fungo, e provocou a deformação de conídios e conidióforos

(FREIRE, 2001). Em estudo realizado por SILVA et al., (2008), avaliando extratos de diferentes plantas medicinais, constataram efeito sobre várias espécies de *Colletotrichum* com destaque para o extrato de boldo da terra (*Cyprinus barbatus*), o qual apresentou efeito inibitório do fungo. SARMENTO-BRUM et al. (2014), testando óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Lippia alba*, *Cymbopogon nardus* e *C. citratus*, obtiveram resultados satisfatórios, pois os mesmos inibiram totalmente o crescimento dos fungos *Pyricularia grisea*, *Ralstonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

De acordo com VERAS (2006), com a utilização das concentrações 2, 4, 6, 8, 10% de resíduos orgânicos, como a casca da mandioca, torta de babaçu, bagaço de cana-de-açúcar e capim citronela, frente ao fungo *Fusarium* sp., isolado do quiabeiro, teve diferença significativa quando comparados ao tratamento controle sem resíduos orgânicos. No entanto, nesse mesmo trabalho quando os resíduos foram comparados entre si, nos tratamentos com cana houve um maior crescimento micelial do fungo, que pode ser explicado pela alta concentração de lignina e alta relação C:N favorecendo o crescimento do *Fusarium* spp., os demais resíduos testados inibiram o crescimento micelial do fungo.

O extrato de albedo possui compostos fenólicos, mas esta concentração é 50% inferior no extrato aquoso do que no extrato metanólico (FILHO, 2003). Este fato poderia explicar a menor inibição do fungo com extrato de albedo nas concentrações testadas, uma vez que a concentração de compostos fenólicos pode ter sido muita baixa, não sendo suficiente para proporcionar efeito sobre os isolados do fungo *Colletotrichum* sp. Esses resultados contrariam os obtidos por (TOFFANO et al., 2012), que utilizou para cada grama de albedo moído, 1 mL de água, e observou o potencial desse extrato como agente de controle da mancha preta dos citros na pós-colheita, reduzindo o aparecimento de novas lesões nos frutos.

Resultados obtidos por FILHO (2003), demonstraram efeito fungitóxico na germinação dos picnidiósporos e formação de apressório do albedo extraído com solvente metanólico sobre *Phyllosticta citricarpa*, no entanto o extrato de albedo autoclavado e o extrato de albedo filtrado em filtro Milipore 22 µm, não apresentaram atividade antifúngica, podendo esse resultado ser em função das substâncias presentes no albedo serem de elevado peso molecular e termolábeis. Deste modo explica-se também os resultados encontrados neste trabalho, pois os extratos estudados foram filtrados em filtro Milipore 22 µm.

Os resultados de ação antifúngica dos produtos agroindustriais testados neste trabalho, pelo método de extração na forma aquosa e em concentrações baixas, mostram que efeito destes extratos para uma maior inibição do patógeno pode ser encontrado em dosagens maiores.

CONCLUSÃO

Os resíduos agroindustriais de manipueira, bagaço de cana-de-açúcar e albedo de citrus possuem efeito de inibição de crescimento micelial sobre o fungo *Colletotrichum* spp., e a medida que é incrementado a concentração dos extratos a atividade antifúngica aumenta.

Os resíduos testados mesmo em concentrações baixas mostraram-se como uma alternativa promissora no controle da antracnose do morangueiro, sendo então uma alternativa a mais dentro do controle integrado desta doença.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, pelo espaço cedido para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 de outubro de 2014.

BENATO, E.A.; CIA, P. **Doenças de Frutos em Pós-colheita e Controle**. In: Manual Pós-colheita da Fruticultura Brasileira / Leandro Camargo Neves (organizador). Londrina: EDUEL, 2009. 494p.

FILHO, J. A. C. **Efeito dos extratos de albedo de laranja (*Citrus cinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acibenzolar-S- metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Telemorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 145f. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade de São Paulo.

FREIRE, F. C. O. **Uso da manipueira no controle do oídio da ceriguelira: resultados preliminares**. Fortaleza: EMBRAPA, 2001, 3p (Comunicado Técnico).

HENZ G. P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 260-265, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362010000300003>>. doi: S0102-05362010000300003.

MACKENZIE, S.J.; SEIJO, T. E.; LEGARD, D. E.; TIMMER, L.W.; CHANDLER, C.K.; PERES, N. A. Resistance of strawberry cultivars to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Florida is nonspecific. **Plant Disease**, v. 90, n. 8, p. 1091–1097, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1091>>. doi: 10.1094/PD-90-1091

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p. 301-307, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/S0103-84782008000200001>>. doi: S0103-84782008000200001.

SARMENTO-BRUM, R. B. C.; CASTRO, H. G.; SILVA, M. L.; SARMENTO, R. A.; NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, G. R. Efeito de óleos vegetais na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 63-70, 2014.

SILVA, K. E.; NÁPOLES, F. A. M.; SOUZA, G. A. V. S.; MONTENEGRO, F.T.; FERREIRA, T. C.; SOUZA, J. T. A. Controle agroecológico do ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*, Banks) no pinhão manso (*Jatropha curcas* L) com diferentes dosagens de urina de vaca e manipueira. In.: VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza, 2011. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011, 5p.

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**, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

TOFFANO, L.; FISCHER, I. H.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S. F. Potencial do flavedo (epicarpo) de *Citrus aurantifolia* cv. Tahiti no controle do bolor verde e da antracnose em citros. **Summa Phytopathologica (Impresso)**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 2012.

UENO, B. Manejo Integrado de Doenças do Morango. In.: Simpósio Nacional do Morango: 2º Simpósio Nacional do Morango e 1º Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul. Pelotas, 2004. **Anais** 2º Simpósio Nacional do Morango E 1º Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul, Pelotas, 2004, 296p.

VERAS, M. S. **Resíduos orgânicos: uma alternativa sustentável na supressividade de *Fusarium* em quiabeiros para a agricultura familiar Maranhense**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão.