

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DE DOSES DE EXTRATOS AQUOSOS E ALCÓOLICOS
DE *Arrabidaea bilabiata* NO CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS.

Bolsista: Milena Castro Miranda, CNPq

MANAUS-AM

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-A/0055/2008

AVALIAÇÃO DE DOSES DE EXTRATOS AQUOSOS E ALCÓOLICOS
DE *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw NO CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGENICOS.

Bolsista: Milena Castro Miranda, CNPq

Orientador: Dra. Jânia Lília da Silva Bentes

MANAUS-AM

2009

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	4
2.OBJETIVOS.....	6
2.1Objetivo geral.....	6
2.2Objetivos específicos.....	6
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 <i>Arrabidaea bilabiata</i>	7
3.2Extratos vegetais e seu principio ativo.....	9
3.3 <i>Colletotrichum guaranicola</i>	13
3.4 <i>Alternaria porri</i>	14
3.5 <i>Sclerotium rolfsii</i>	15
4.MATERIAL E MÉTODOS.	
4.1 Obtenção do isolado do fungo.....	18
4.2 Obtenção do extrato aquoso.....	19
4.3 Preparo do meio de cultura com os extratos vegetais.....	21
4.4 Avaliação do crescimento e esporulação do patógeno.....	23
5.RESULTADOS.....	24
6.REFERÊNCIAS.....	30
7.CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	33

Resumo

Nos últimos anos muitos extratos de plantas vêm sendo estudados para o controle de doenças devido à presença de substâncias que podem apresentar ação antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos. Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o uso de extratos de plantas em ensaios *in vitro*, conseguindo bons resultados no controle de doenças. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de doses dos extratos aquosos de *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw. no controle de fungos fitopatogênicos. Foi utilizado folhas secas e trituradas de *Arrabidaea bilabiata*, coletadas no município de Autazes-AM. Utilizou-se 25g de folhas de *Arrabidaea bilabiata* para se obter o extrato em água destilada onde foi filtrado em gaze, papel de filtro e esterelizado em filtro Milipore 0,45µm , onde foi utilizado no preparo do meio de cultura para o cultivo dos fungos. Os experimentos permaneceram em BOD e foram realizadas medições diárias do crescimento micelial e a contagem de esporos e escleródios produzidos pelos fungos e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O extrato aquoso na concentração 20% e 40% inibiram a produção de esporos de *C.cassicola* apresentando maior eficiência em relação aos demais tratamentos, O extrato aquoso nas concentração 5,10,20 e 40% favoreceu a produção de escleródios em *Sclerotium rolfsii*, quanto ao crescimento micelial de *S. rolfsii* e *C.cassicola* não houve diferença significativa

1. INTRODUÇÃO

Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos

Atualmente, em todos os lugares do mundo onde se pratica uma agricultura econômica, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente utilizada através de pesticidas. Sem dúvida, o uso racional destes produtos pode ter, em curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto, em longo prazo, além do surgimento de isolado dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido à poluição causada pelos resíduos (KIMATE et al., 2005).

A restrição ao uso de fungicidas, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e resistência pelo patógeno, tem levado a procura de métodos alternativos de controle tais como, uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais. Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para uma utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (FRANCO e BETTIOL, 2000; BENATO et al., 2002; CARRÉ et al., 2002; MOREIRA et al., 2002).

A adoção de uma agricultura mais ecológica possui entre os seus princípios o uso do controle alternativo de pragas e doenças de plantas, que inclui o uso de produtos naturais com atividade indutora de resistência e/ou com atividade antimicrobiana direta. Nos últimos anos muitos extratos de plantas vêm sendo estudados e utilizados para o controle ou manejo de doenças devido à presença de substâncias no tecido destas que podem

apresentar ação antimicrobiana ou induzir resistências nas plantas que são aplicadas, contra uma ampla gama de patógenos.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos visando o controle de microrganismos com o uso de extratos de plantas em ensaios *in vitro*, conseguindo bons resultados no controle de doenças a nível, de campo e de laboratório. Neste contexto, termos como agricultura alternativa ou sustentável obtêm expressão política e estimulam a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (BALBI-PEÑA, 2005).

Em nossa região, a ocorrência de doenças em plantas tem sido um dos grandes problemas enfrentados pelos pequenos agricultores, principalmente devido às condições ambientais favoráveis ao surgimento de diversas epidemias, seja de origem fúngica, bacteriana ou viral. Diante disto, uma das estratégias utilizadas pelos produtores é o controle químico, o qual envolve riscos ambientais e ao homem.

Desta forma, a busca de métodos alternativos de controle destes patógenos, é de grande interesse, pois além de reduzir os custos de produção, podendo ser produzidos na propriedade, sem o gasto com insumos, não acarretando danos ao ambiente e à sociedade (KIMATE et al., 1997). Tendo em vista a propriedade inibitória de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos, e o potencial destes extratos como método alternativo, de fácil condução e economicamente viável para controle de doenças de plantas, além da importância das doenças fúngicas para os pequenos agricultores regionais (BALBI-PEÑA, 2005).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* de doses dos extratos aquosos e alcoólicos de *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw. no controle de fungos fitopatogênicos.

Objetivos específicos

Avaliar o crescimento micelial de *Colletotrichum guaranicola*, *Alternaria porri* e *Sclerotium rolfsii* e *Corynespora cassiicola* em meio de cultura com o extrato de *A. bilabiata*;

Avaliar o efeito do extrato aquoso de *A. bilabiata* na produção de conídios de *C. guaranicola*, *A. porri* e *C. cassiicola* e escleródios de *S. rolfsii*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Arrabidaea bilabiata*

Arrabidaea bilabiata (Sprague) Sandw., da família Bignoniaceae, conhecida pelos nomes populares de “gibata” ou “chibata”, é a planta tóxica para herbívoros mais importante das regiões de várzea da Bacia Amazônica e a segunda em importância considerando toda a Região Amazônica. A toxicidade de *A. bilabiata* é conhecida pela grande maioria dos criadores da região de sua ocorrência (TOKARNIA et al., 1979) .

No Brasil, é abundante em muitas áreas da Bacia Amazônica, mas ocorrem somente nas partes baixas (várzeas, restingas e abas de teso) que se inundam durante o período da “cheia”, isto é, nas margens do Rio Amazonas, de seus paranás, lagos e afluentes (TOKARNIA et al., 1979).

Sob condições naturais, a intoxicação por *A. bilabiata* ocorre em bovinos e búfalos; o búfalo é pelo menos duas vezes mais resistente que o bovino à ação tóxica de *A. bilabiata*. Os sintomas de intoxicação por *A. bilabiata*, nos bovinos iniciam-se aproximadamente de 6 a 24 horas após a ingestão da planta: quanto maior a quantidade ingerida, menor é a evolução de intoxicação, que geralmente é superaguda, de minutos nos casos fatais.

Os animais, quando movimentados, caem ou se deitam precipitadamente. Ficam logo em decúbito lateral, fazem movimentos de pedalagem, às vezes cerram fortemente as pálpebras, berram e morrem. Ainda são observados especialmente nos animais em que a evolução é um pouco mais longa ou nos que sobrevivem, tremores musculares, dispnéia, pulso venenoso positivo, taquicardia, micções e defecações freqüentes. Exercício físico precipita o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais. (TOKARNIA et al., 1979).

As menores incidências de intoxicação por plantas do grupo das que causam “morte súbita”, em búfalos na Amazônia, deve-se em parte, à maior resistência dessa espécie animal. Também parece importante a coincidência do habitat preferencial dos búfalos (várzea) com o habitat de *A. bilabiata*.

Trepadeira escandente da várzea, causa de “mortes súbita” em bovinos, especialmente quando os animais são movimentados; planta que os bovinos só ingerem quando com fome, de toxicidade variável, sem efeito acumulativo é a segunda planta tóxica em importância na Amazônia. Nos experimentos realizados a dose letal tem variado bastante, 1,25 gramas das folhas frescas por quilograma de peso do bovino causaram graves sintomas de intoxicação, e 2,5 g/kg provocaram a morte. (GONZALEZ et al., 2000).

Não se conhecem ainda todos os fatores responsáveis pela grande variação da toxidez da planta. Na Venezuela onde a planta ocorre nas margens do Rio Orenoco e em algumas partes de seus afluentes, tem sido sugerido que a estação do ano tem influencia na toxidez; quanto maior a precipitação pluviométrica, menos tóxica a planta. A planta dessecada também é tóxica. (GONZALEZ et al., 2000).

Em relação ao princípio tóxico, foi relatada na Venezuela a identificação de glicosídeos do tipo esteróides cárdio-ativos. Posteriormente foi demonstrada a presença de ácido fluoracético nas folhas de *A. bilabiata*. Extratos desta planta foram testados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. e *Candida albicans*. Todos os isolados microbianos mostraram-se resistentes aos extratos, exceto *C. albicans*, sugerindo uma possível atividade antifúngica (GONZALEZ et al., 2000).

3.2 Os extratos vegetais e seu princípio ativo

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças de plantas, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas (não são incluídos nesse conceito o controle químico clássico e o melhoramento genético) (STANGARLIN; SCWAN; CRUZ; NOZAKI, 1999).

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas.

Até o momento não se conhece quase nada sobre a composição química de 99,6 % das plantas de nossa flora, estimadas entre 40 mil a 55mil espécies (GONZALEZ et al., 2000). Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários das plantas tóxicas e medicinais já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foram estudados quanto suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias como: alcalóides, terpenos lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenoides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides entre outras (STANGARLIN; SCWAN; CRUZ; NOZAKI, 1999).

Quando estes compostos são extraídos das plantas por processos específicos, como a destilação por arraste de vapor de água origina líquidos de consistência semelhante ao óleo, voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, denominados óleos essenciais (SILVA et al., 1979). Compostos secundários de plantas estão distribuídos em um grande número de famílias botânicas, com muitos deles apresentando atividade antimicrobiana como é caso dos alcalóides com

origem biossintética a partir da via metabólica do ácido shiquímico (BOLKHAN; RIBEIRO, 1981).

As plantas são fontes de um amplo espectro de mais de 100.000 produtos naturais de baixos pesos moleculares, conhecidos como substâncias vegetais ou metabólitos secundários (BOLKHAN; RIBEIRO, 1981). Nos vegetais, estes compostos podem estar associados à diferenciação celular, regulação do crescimento, a mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente, proteção (RODRIGUES; SCHWAN-ESTRADA; FIORI; STANGARLIN; CRUZ, 2007). Dentre os metabólitos secundários, destacam-se os polietienos encontrados em *Tagetes* sp, isotiocianatos e glicosinolatos oriundos de *Brassica* sp. e outros compostos isolados de diferentes famílias vegetais, como glicosídeos cianogênicos, poliacetilenos, alcalóides, compostos fenólicos entre outros (VERPOORTE e MEMELINK, 2002; TAIZ e ZIEGER, 2004; DIXON, 2005).

Adicionalmente, extratos vegetais possibilitam, por exemplo, a obtenção de novos produtos, aos quais os fitopatogenos ainda não podem inativar, são rapidamente biodegradados além de apresentar vários modos de ação, tornando possível um vasto espectro de uso enquanto retém uma ação seletiva dentro de cada classe de peste, e por fim, são derivados de recursos renováveis, diferentemente dos materiais sintéticos (FERRAZ e FREITAS, 2000).

O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de plantas. Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas da flora nativas, tem indicado o potencial da mesma no controle de fitopatógenos, tanto por sua

ação fungitóxica direta inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com características de elicitor (es) (WILSON e GHAOUTH et al., 1997).

Tanto o extrato bruto quanto o óleo essencial de plantas tem sido utilizado para estudo *in vitro*, de inibição de crescimento micelial e esporulação de fungo e crescimento de bactérias (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora sp.*, e *C.guaranicola*). Tanto para as doenças causadas por fungos, quanto para as causada por bactérias e nematóides, o controle, atualmente, depende de fungicidas e nematicidas sintéticos, respectivamente. Aliado aos problemas ambientais e de saúde pública associados ao uso de pesticidas, recentemente vem ocorrendo uma crescente pressão sobre as grandes redes de varejo para a oferta de produtos que sejam mais seguros tanto aos consumidores quanto ao meio ambiente (DOLTSINIS; SCHMITT et al., 2002).

Esses problemas expressam claramente a importância e a necessidade de pesquisas para a busca de alternativas menos danosas ecologicamente, eficientes e mais específicas para o controle de fitopatógenos. Ribeiro e Betendo (1999) observaram que os extratos aquosos de alho inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (agente causal da podridão dos frutos do mamoeiro) em porcentagens variáveis de 5,3 a 67,6%, e os extratos de hortelã, mamona e pimenta reduziram drasticamente a produção de conídios em níveis variáveis de 41 a 84%, de acordo com as concentrações crescentes dos extratos.

Balbi-Peña et al. (2006), testaram a eficiência de extratos de *Curcuma longa* (cúrcuma) e solução de curcumina para controle de *Alternaria solani* em tomateiro em cultivo protegido, utilizando como tratamentos controle acibenzolar-S-metil (ASM-125mg i.a./L), um fungicida protetor (oxicloreto de cobre – 1100mg i.a./L) e um fungicida

sistêmico (azoxystrobin – 80mg i.a./L). Todos os tratamentos apresentaram valor de área abaixo da curva de progresso da doença estaticamente menor do que a testemunha.

Dentre os mesmos, tratamento com ASM foi o menos eficiente, mas não diferindo estatisticamente de cúrcuma 10% e curcumina 100mg/L. cúrcuma 1%, curcumina 50mg/L e oxicloreto de cobre apresentaram melhor nível de controle, mas ainda inferior estatisticamente ao obtido pelo fungicida azoxystrobin. Quanto ao tamanho dos frutos, o tratamento de curcumina 50 mg/L foi o único que apresentou menor porcentagem de frutos pequenos e maiores de frutos grandes em relação à testemunha.

Franzener et al. (2003), que controlaram a mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana*) em trigo usando extrato aquoso de *Artemisia camphorata* (cânfora). Bonaldo et al. (2004) observaram o controle da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em pepino utilizando o extrato de *Eucalyptus citriodora*. Rodrigues et al. (2007) estudaram o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em alface por *Zingiber officinalis* (gingibre).

Franzener et al., (2007) verificaram a atividade de fitoalexinas em sorgo, antifúngica contra *Alternaria brassicae* e antibacteriana contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelos hidrolatos das plantas *Helietta apiculata* (canela-de-veado), *Conyza canadensis* (buva) e *Cymbopogon nardus* (citronela).

3.3 *Colletotrichum guaranícola* Albuquerque

O Brasil é o maior produtor de guaraná, sendo que sua produção está concentrada no estado do Amazonas, um dos fatores limitantes para a expansão da atividade é a alta incidência de doenças, sendo sua principal doença a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* (Figura 1). O patógeno infecta folhas e caules tenros em todos

os estádios da planta, ocorrendo em todas as regiões da Amazônia (TRINDADE e POLTRONIERI, 1997).

Sintomas: A doença causa necrose dos limbos e pecíolo das folhas e das hastes em início de desenvolvimento. As partes necrosadas adquirem a coloração marrom-avermelhadas. Os folíolos, à medida que secam, tornam-se quebradiços. Lesões isoladas apresentam formato variável de circular a elíptico. O coalescimento das lesões acarreta a queima de extensas áreas de folíolos com maior predominância em seus bordos. Quando a lesão afeta as nervuras, provoca deformação e enrolamento dos folíolos, principalmente quando jovens (Figura 1). Quando as condições são muito favoráveis para as doenças tais como umidade elevada e planta debilitada, pode acarretar a queda de um grande número de folha, seca dos galhos e, conseqüentemente, morte da planta (TRINDADE e POLTRONIERI, 1997).



Figura 1- (A) Sintomas de antracnose em plantas de guaranazeiro. (B) Isolado de *Colletotrichum guaranicola* . Fotos: Jânia Lília

3.4. *Alternaria porri* (Ell.) Cif.

A mancha púrpura ou olho-de-pombo, causada por *Alternaria porri* (Ell.) Cif., (Figura 2) é a principal doença das *Aliáceas* (KIMATI, 2005). Trata-se de uma doença de ocorrência generalizada em todas as regiões onde se cultivam alho e cebola, causando danos severos e reduzindo a produção em 50-60%, a doença afeta também a conservação dos bulbos e a produção de sementes (ZAMBOLIM et al., 2000).

O gênero *Alternaria* é composto por fungos mitospóricos ou imperfeitos, Deuteromycetes, ordem Miniliales, família Dematiaceae, que caracterizados por não apresentarem uma fase sexuada (LOGUERCIO–LEITE *et al.*, 2004). Possuem conídios com comprimento e largura variáveis, geralmente individuais e raramente catenulados, retos ou ligeiramente curvos, com corpo oblongo ou elipsoidal que se afina em direção ao ápice, formando uns bicos compridos, sinuosos e ocasionalmente ramificados. Apresentam coloração palha, parda ou ouro claro, com septos transversais e poucos ou nenhum longitudinal. Um importante atributo do gênero *Alternaria* é seu curto ciclo de vida (OLIVEIRA *et al.*, 1995). Certamente, um ciclo de vida com curto tempo é vantajoso porque pode promover um rápido desenvolvimento e progresso da doença. Produção freqüente ou continua de conídios na lesão estabelecida durante condições favoráveis é de igual importância (STRANDBERG, 1992).

O gênero *Alternaria* têm grande importância econômica por abranger vários patógenos de plantas, alguns dos quais causam grandes prejuízos econômicos (ROTEM,

1994). Dentre os membros deste gênero, a espécie *A. porri* é uma das mais conhecidas e expressivas economicamente (BONDE, 1929).

De acordo com Figueira (2003), os sintomas primários se manifestam caracteristicamente nas folhas, inicialmente na forma de pequenas manchas brancas, coloração púrpura com zonas concêntricas mais escuras, que correspondem á frutificação do fungo, as folhas atacadas ficam inviáveis para o comércio (Figura 2).

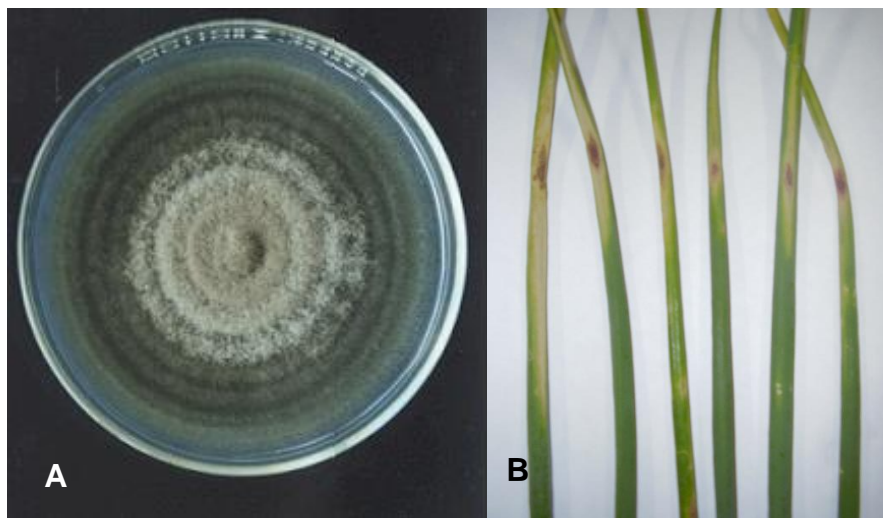


Figura 2. (A) – Isolado de *Alternaria porri*. Fonte: www.biotech.or.th/tnc/dbstore/pic/DOAC_0126.jpg. (B) – Folhas de cebolinha com sintomas de mancha de alternaria.

3.5. *Sclerotium rolfsii*

O Sclerotium rolfsii é o agente causal da murcha-de-esclerócio. Apresenta corpos de frutificação assexual e esporos ausentes, formando esclerócios escuros, marrons ou pretos, globosos ou irregulares e compactos, com micélio septado, branco (Figura 3) sobre os quais visualiza-se os esclerócios. (AGRIOS, 2005).

Esta doença ocorre de forma generalizada em todo o Brasil, atingindo além do pimentão e feijão, diversos cultivos de grande importância econômica. Embora bastante

disseminada, a doença geralmente não ocasiona prejuízos elevados, pois o patógeno depende fundamentalmente das condições favoráveis para o seu desenvolvimento; Porém a região Norte apresenta todas as características fundamentais para seu desenvolvimento. (AGRIOS, 2005).

Condições altamente favoráveis nas épocas de cultivo e uso de variedades comerciais suscetíveis tornam seu controle muito difícil. A gama de hospedeiros do patógeno abrange quase 100 famílias botânicas; Além disso, o fungo é capaz de multiplicar-se na matéria orgânica morta no solo, como ocorre nas áreas de renovação de canaviais, em Ribeirão Preto, onde o patógeno se reproduz nos restos de cultura de cana-de-açúcar (BARRETO, 2003).

As lesões aparecem no colo ao nível do solo na forma de manchas escuras, encharcadas que se estendem pela raiz principal, produzindo uma podridão cortical recoberta por um micélio branco e numerosos esclerócios (Figura 3), inicialmente brancos e, posteriormente marrom-escuro. Na parte aérea apresenta amarelecimento, desfolhação dos ramos superiores e uma murcha que conduz à seca total. Nas vagens próximas do solo o micélio ocasiona a podridão, no caso do feijão. No pimentão ocorre murchamento das folhas, resultando no apodrecimento da base do caule e das raízes. (AGRIOS, 2005).

A murcha do *S. rolfsii* foi relatada em condições de viveiro, causando lesões necróticas no colo de plantas de cajueiro com um a três meses de idade. No tecido necroso apresentam-se estruturas do patógeno, representadas por um micélio branco bem desenvolvido e escleródios inicialmente brancos e que se tornam escuros quando maduros. Como sintomas reflexos da doença ocorrem murchamento e morte da planta (MENEZES, 2001).

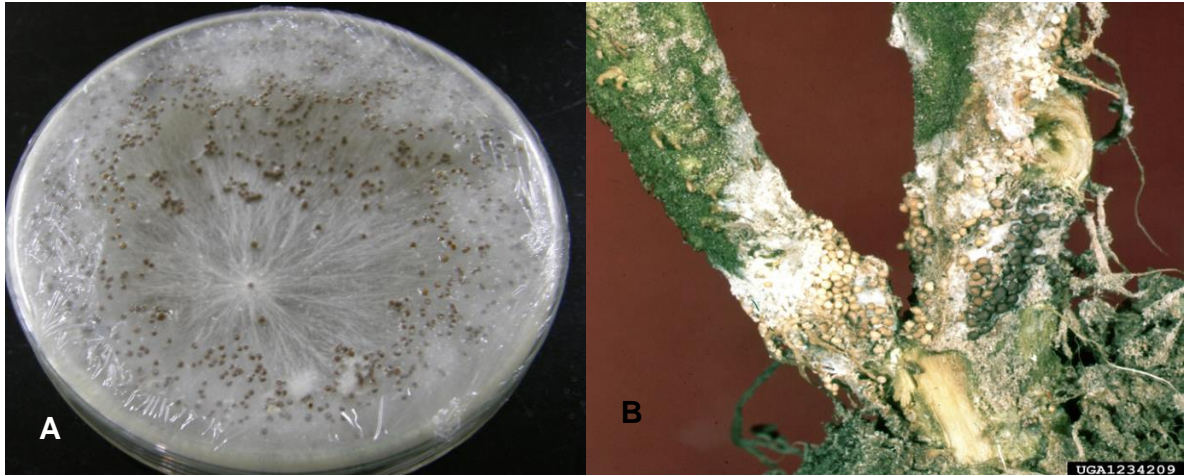


Figura 3. (A) – Isolado de *Sclerotium rolfsii*. Foto: Milena Castro. (B) Sintomas de esclerócio em planta de pimentão

3.6 *Corynespora cassicola*

A mancha-de-corinéspora ou mancha-alvo é uma doença da parte aérea do tomateiro, muito importante na região Norte e no Estado do Maranhão, mas que até pouco tempo era praticamente ausente nas outras regiões produtoras do País (LOPES *et al.*, 2005). É uma doença típica de clima tropical úmido, sendo sua ocorrência muito rara e pouco severa em regiões de clima tropical de altitude ou subtropical. Entretanto, no verão de 2006/2007, ocorreram chuvas intensas e temperaturas mais altas do que o normal nas regiões Centro- Oeste e Sudeste e foram observadas epidemias severas de mancha-alvo em lavouras comerciais de tomate de mesa nos municípios de Nerópolis, Goianópolis e

Anápolis, em Goiás em Minas Gerais. Além disso, também foram observadas epidemias da doença em tomate em cultivo protegido nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul nos anos de 2005 e 2006, respectivamente. Estas epidemias de mancha-alvo foram particularmente preocupantes porque o patógeno atacou principalmente os frutos, tanto os verdes como aqueles no ponto de colheita, causando prejuízos diretos aos produtores. Muitos destes prejuízos relatados recentemente no centro-sul do Brasil foram agravados porque a maioria dos produtores não estava familiarizada com a doença e métodos de controle adequados não foram implementados neste sentido, este comunicado visa documentar os aspectos mais importantes relacionados à diagnose e o controle da doença podendo servir, desta forma, como um guia para produtores e extensionistas.

Os sintomas da mancha-alvo podem ser facilmente confundidos com os da pinta-preta causada pelo fungo *Alternaria solani* ou da mancha e pinta-bacterianas, causadas pelas bactérias *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Inicialmente são observadas manchas pequenas e aquosas na superfície da folha. Estas aumentam de tamanho, se tornam circulares e de coloração marrom clara. As manchas são circundadas por um halo clorótico e se diferenciam daquelas causadas por *A. solani* devido à ausência de anéis concêntricos (JONES et al., 1991). Sintomas em ramos e pecíolos são manchas amarronzados e alongados. Nos frutos, inicialmente são observadas pontuações marrom-escuras e circulares. Estas aumentam e tornam-se marrons com um centro mais claro, que podem rachar, formando verdadeiras "crateras" nos frutos. Os frutos maduros desenvolvem lesões circulares marrons, com o centro mais claro, que racham.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do isolado do fungo

Os isolados foram obtidos a partir de plantas com sintomas típicos das doenças causadas pelos fungos *Colletotrichum guaranicola*, *Alternaria porri*, *Corynespora cassiicola* e *Sclerotium rolfsii*, coletadas em áreas de produtores rurais, nas cercanias da cidade de Manaus no estado do Amazonas. As folhas foram coletadas em sacos de papel e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da FCA/UFAM, onde estão sendo realizados os experimentos.

Inicialmente as amostras com sintomas foram lavadas em água corrente, em seguida retiraram-se fragmentos de aproximadamente 5mm² da área de transição entre a área lesionada e a sadia. Os fragmentos foram submetidos a uma desinfestação superficial em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio a 2% por 30 segundos em seguida, lavados com água destilada esterilizada por três vezes, e deixados para secar em papel de filtro esterilizado. Após a assepsia, e em câmara de fluxo laminar vertical, foram depositados cinco fragmentos equidistantes em placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose; 20g de ágar, 1 litro de água destilada), acrescido do antibiótico cloranfenicol (250mg/L), para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram mantidas em temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Ao surgirem os primeiros fragmentos de hifas do fungo, estas foram repicadas para novas placas contendo mesmo meio de cultura acima, para individualização das colônias (Figura 4). Após a obtenção do isolados, este foi mantido em tubos de ensaio com meio BDA inclinado em incubadora

BOD a 18°C, visando à conservação do material fúngico, para uso nos ensaios seguintes, quando este será novamente repicado para placas de Petri para o desenvolvimento das colônias do patógeno em estudo.

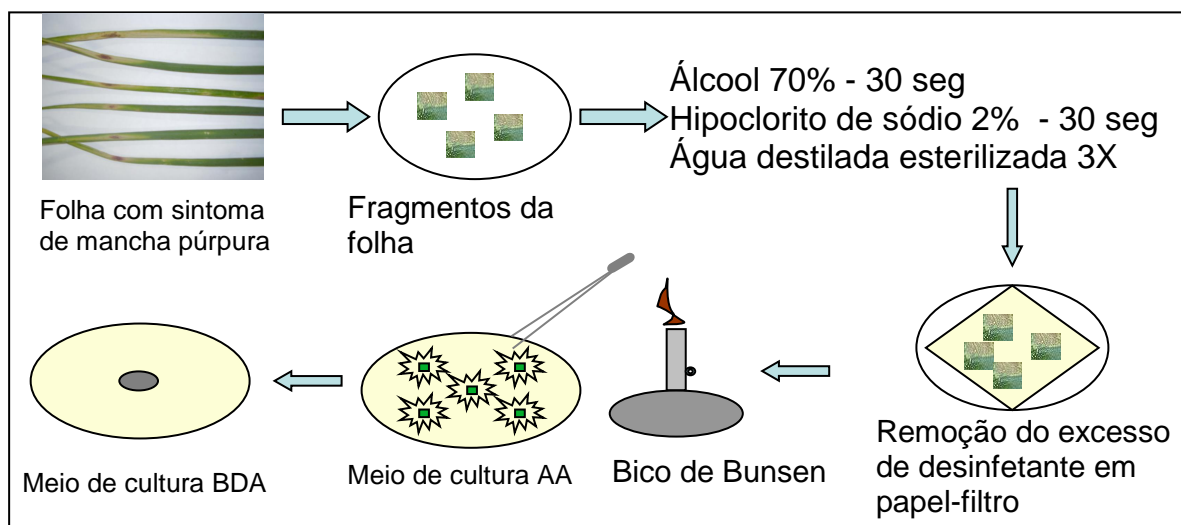


Figura 4. Esquema de isolamento de fungos fitopatogênicos

4.2 Obtenção do extrato aquoso

Para obtenção do extrato aquoso foram utilizadas folhas secas e trituradas de *A. bilabiata*, coletadas no município de Autazes, Amazonas. Para o preparo utilizou-se 100g de folhas moídas de *A. bilabiata*, que foi obtido por infusão em 2L de água destilada. A mistura foi agitada durante 10 minutos e deixada em repouso durante 48 horas. Decorrido este tempo o extrato foi filtrado em gaze por duas vezes e em papel de filtro Whatman número 1 por três vezes, onde foi utilizado no preparo do meio de cultura para o cultivo do fungo (Figura 5).



Figura 5. Esquema para o preparo do extrato aquoso de *Arrabidaea bilabiata*.

4.3 Preparo do meio de cultura com os extratos vegetais

O meio de cultura utilizado foi o BDA básico, acrescido de extrato vegetal de *A. bilabiata*. As doses utilizadas para o extrato aquoso foram 0% (testemunha), 5% (12,5 mL de extrato), 10% (50 mL de extrato), 20% (100 mL de extrato), 40% (150 mL de extrato) (v/v). O BDA (200g de batata, 12g de dextrose e 12g de agar) foi preparado como de rotina, um dia antes da montagem do ensaio experimental e esterilizado por autoclavagem (121° C/15 minutos). No dia da montagem do experimento, o BDA foi fundido em microondas e adicionou-se o extrato vegetal, esterilizado por filtração em filtro Milipore 0,45µm (Figura 6). O meio foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar). Após a solidificação foi depositado no centro da placa, um escleródio, para avaliar o crescimento micelial do fungo. A testemunha constará do cultivo do patógeno em meio BDA sem o extrato vegetal.

Foram realizados dois ensaios, separadamente, um para cada patógeno avaliado (*S. rolfii* e *C. cassiicola*). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em com cinco tratamentos (cinco doses) e dez repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.



Figura 6. Esquema da montagem do ensaio com o extrato vegetal de *Arrabidaea bilabiata* e o fungo *Sclerotium rolfsii*. Fotos: Luciana Souza.

4.4 Avaliação do crescimento micelial e produção de escleródios e esporos de *S. rolfsii* e *C. cassicola* respectivamente.

A avaliação do efeito do extrato vegetal no crescimento micelial foi feita todos os dias, pela medição do comprimento e largura das colônias, utilizando-se uma régua milimetrada, até todos os tratamentos alcançarem a borda da placa.

Imediatamente depois de encerrada a avaliação do crescimento micelial, iniciou-se a avaliação da produção de escleródio e esporos produzidos pelos fungos, por meio da contagem do número de escleródios e esporos em cada tratamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios foram repetidos duas vezes com os fungos *S. rolfisi* e *C. cassiicola*. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa SAEG versão 9.0, para a discriminação da reação do fungo às diferentes doses do extrato vegetal. Nas tabelas 1 e 2 estão dispostas as médias anotadas do crescimento micelial e numero de escleródios produzidos pelo do fungo avaliado.

Tratamento (Doses)	Diâmetro médio da colônia (cm)	Número de escleródios
0%	6.5 ^A	272.10 ^B
5%	6.3 ^A	1302.3 ^A
10%	4.8 ^A	1097.4 ^A
20%	5.5 ^A	1209.7 ^A
40%	4.6 ^A	1020.7 ^A

Tabela 1. Diâmetro médio das colônias e número de escleródios de *S. rolfisi* avaliados quanto ao efeito de diferentes doses do extrato vegetal de *A. bilabiata* (1º Ensaio).

Tratamento (Doses)	Diâmetro médio da colônia	Número de escleródios
0%	5.6 ^A	358.2 ^B
5%	5.1 ^A	987.1 ^A
10%	4.5 ^{AB}	791.3 ^A
20%	4.4 ^{AB}	358.2 ^A
40%	2.8 ^A	791.3 ^{AB}

Tabela 2. Diâmetro médio das colônias e numero de escleródios de *S. rolfisi* avaliados quanto ao efeito de diferentes doses do extrato vegetal de *A. bilabiata* (2º Ensaio).

Nas tabelas 3 e 4 estão dispostas as médias anotadas do crescimento micelial e numero de esporos produzidos pelo do fungo avaliado.

Tratamento (Doses)	Diâmetro médio da Colônia	Número de Esporos
0%	4,6 ^A	120.4 ^A
5%	4,8 ^A	123.4 ^A
10%	5,01 ^A	122.8 ^A
20%	5,0 ^A	24.8 ^B
40%	4,9 ^A	37.8 ^B

Tabela 3. Diâmetro médio das colônias e número de esporos de *C.casiicola* avaliados quanto ao efeito de diferentes doses do extrato vegetal de *A. bilabiata* (1º Ensaio).

Tratamento (Doses)	Diâmetro médio da colônia	Número de esporos
0%	5,1 ^A	125.3 ^A
5%	4,8 ^A	124.6 ^A
10%	4,6 ^A	125.3 ^A
20%	4.7 ^A	47.8 ^B
40%	5.0 ^A	35.8 ^B

Tabela 4. Diâmetro médio das colônias e número de esporos de *C.casiicola* avaliados quanto ao efeito de diferentes doses do extrato vegetal de *A. bilabiata* (2º Ensaio).

Os resultados obtidos para *S. rolfsii* e *C. asiicola* podem ser vistos na (Tabela 1 e 2), e (Tabela 3 e 4) respectivamente os dados permitem observar que extrato testado não demonstrou propriedades fungitóxica nas doses 5, 10, 20 e 40% no crescimento micelial de *S. rolfsii* (Tabela 1) e *C. asiicola* (Tabela 3) mesmo nas concentrações mais elevadas de acordo com o teste de Tukey 5%, não houve diferença significativa. Foi observado uma maior produção de escleródios em *S. rolfsii* nos diferentes tratamento quando comparado com a testemunha, sugerindo um efeito estimulador do extrato vegetal na produção destas estruturas.

Por outro lado, o extrato de *A. bilabiata* promoveu redução da esporulação de *C. asiicola*. Os efeitos mais notórios foram observados nas doses 20 e 40% sendo a esporulação reduzida em até 62% e 70,45 % respectivamente em relação à testemunha. Para as demais doses (5 e 10%), não foi observado efeito do extrato vegetal na produção de esporos. Extratos desta planta foram testados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. e *Candida albicans*. Todos os isolados microbianos mostraram-se resistentes aos extratos, exceto *C. albicans*, sugerindo uma possível atividade antifúngica (GONZALEZ et al., 2000).

Como ocorreu no ensaio com *C. asiicola* na redução da esporulação, esta atividade antifúngica pode estar relacionada à atividade biológica dos compostos secundários presentes no extrato de *A. bilabiata* e ao princípio tóxico da mesma. Foi relatada na Venezuela a identificação de glicosídeos do tipo esteróides cárdio-ativos, posteriormente foi demonstrada a presença de ácido fluoracético nas folhas de *A. bilabiata* (GONZALEZ et al., 2000).

A fungitoxicidade de extratos vegetais tem sido assinalada em vários trabalhos. Bolkhan e Ribeiro (1981) constataram que o uso de extrato de bulbilhos de alho na

concentração 5000 ppm promoveu inibição de 37, 66 e 76 % no desenvolvimento de micélio de *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente.

Resultados obtidos por Chalfoun e Carvalho (1987) revelaram que o extrato de bulbilhos de alho foi altamente eficiente na inibição do crescimento micelial de *Gibberella zea*, *Alternaria zinniae* e *Macrophomina phaseolina*. Bastos (1992) relata uma alta inibição sobre o desenvolvimento de micélio de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora*, tendo sido observada uma relação direta entre a concentração de extrato de alho no meio e taxa de inibição de crescimento da colônia. Também fungos dos gêneros *Curvularia* e *Alternaria* apresentaram menor desenvolvimento de colônia, com valores variáveis de 30 a 75%, quando cultivados em meios contendo extrato de alho nas concentrações de 1000 a 10000 ppm, respectivamente (Barros et al., 1995).

Segundo Lo et al., (1996) o efeito de extratos vegetais sobre fungos pode estar relacionado com a presença de fitoalexinas que podem ter efeito danoso às células fúngicas como a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, que reflete na inibição da germinação, na redução ou inibição do crescimento micelial, podendo refletir na produção de esporos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a presença de propriedades antifúngicas no extrato aquoso de *A. bilabiata*, podendo ter potencial como alternativa de controle de *C. cassiicola*, por inibir a formação de esporos do fungo, reduzindo desta forma a quantidade de inóculo do patógeno a ser disseminado para outras plantas no campo. Com relação ao fungo *S. rolfsii*, em função da sua atividade estimulatória observada *in vitro*, quanto à produção de escleródios, o uso do extrato de *A. bilabiata* em campo não é recomendável,

uma vez que os escleródios constituem-se em estruturas de resistência e sobrevivência do patógeno extremamente eficientes, podendo permanecer no campo por vários anos (AGRIOS, 2005), dificultando o controle da doença.

O presente estudo deverá continuar em andamento, para averiguar o efeito do extrato aquoso de *A. bilabiata* sobre os fungos *A. porri* e *C. guaranicola* e da ação do extrato alcoólico da planta sobre os fitoatógenos.

CONCLUSÕES

O extratos aquoso de *A. bilabiata*, nas doses 5, 10, 20, 40% promoveram um estímulo na produção de escleródios de *S. rolfsii*; comparada com a testemunha, e nas doses de 20% e 40%, mostraram efeito inibitório sobre a produção de esporos de *C. cassicola*, quanto ao crescimento micelial não houve efeito do extrato. O extrato aquoso de *A. bilabiata* apresentou potencial como agente de controle alternativo de *C. cassicola*.

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmacia**, Supl. v. 2, n. 2, p. 5-8. 2005.

BALBI-PENÑA, M.I. **Efeito do extrato do rizoma de *Curcuma longa* e solução de curcumina em *Alternaria solani* e controle de pinta preta em tomateiro.** Dissertação de Mestrado. Marechal Cândido Rondon PR. Universidade Estadual do Oeste de Paraná. 2005.

BOLKHAN, H.A.; RIBEIRO, W.L. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.565-566, 1981.

BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.19, 1929. 533-548p.

BONALDO, S. M.; et. al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptos citriodora*. **Fitopatol. Bras.** V. 29, n. 2, p. 128-134. 2004.

BARROS, S.T.; OLIVEIRA, N.T.; MAIA, L.C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.168-170, 1995.

BASTOS, C.N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.454-457, 1992.

CORTES, P. R. Uma etiologia de la borrachera del llano. **Revta. Ganagrínco**, Caracas, 4(18), 5(19, 20, 21,22), 6(23,24), 1969/1971.

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234-235, 1987.

COSTA. H. (ed). Controle de doenças de plantas – hortaliças. Vol. 2. UFV - Viçosa. 2000. p 637 – 664.

DOLTSINIS, S; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. **Crop Protection**, v. 17 n.8, p.649-656, 2002.

FERRAZ e FREITAS, (Ed). Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis, SC: CCA/UFSC. 2000. 293 p.; il. 21 cm.

FRANZENER, G.; et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá/PR, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

FRANZENER, G. et al. Atividade antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

GONZÁLEZ, B. *et al.* Chemical Composition And Biological Activity Of Extracts From *Arrabidaea Bilabiata*. **Pharmaceutical Biology**. v. 38, n. 4, p. 287-290. 2000.

HARAGUCHI, MITSUE. Palestra: Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Instituto Biológico**, São Paulo/SP, v.65, n.1/2, p.37-39, jan./dez., 2003.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. EducS, 2004. 47-88 p.

LOPES, Carlos Alberto. ÀVILA, Antônio Carlos. **Doenças do Pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003, 96p.

MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. **Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta**. IN :ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO do VALE, F. X.;

PRESTES, A.M. e GOULART, L.R. Transferência de resistência a doença de espécies silvestres para espécies cultivadas. **RAPP**. Vol. 3. 1995. p. 315- 363.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**. V. 56, n. 4, p. 1267-1271. 1999. Supl.

RODRIGUES, E et al;Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, p. 20-24, 2007.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity, APS-press, St. Paul, MN, USA. 1994. SOUZA, A. G. C.; et al **Fruteiras da Amazônia**. Ed. EMBRAPA/SPI. Brasília-DF.

STANGARLIN. et al 1999. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, 11:16-21.

STRANDBERG, J.O. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. **Alternaria biology, plant disease and metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 1992. 175 – 208p.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. INPA. Manaus. 1979. 95 p. il.

TRINDADE, D.R.; POLTRNIERI, L.S. Doenças do Guaraná. In: KIMATI, at al, **Manual de Fitopatologia vol.2: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Ceres. 1997.p.459-462.

WAX, L.M. Weed control. In: CALDWELL, B.E. (ed.). Soybean improvement production and uses. **Amer. Soc. Agron.**, Madison, 1973. p.417-457.

WILSON e GHAOUTH, A.E.; WINIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, p.204-210, 1997.

ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R. e COSTA, H. (Eds.) **Controle de Doenças de Plantas: Hortaliças**. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. pp. 699-756.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
01	Levantamento de literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
02	Coleta de material vegetal para obtenção dos isolados fúngicos						R						
03	Obtenção do isolado dos fungos						R						
04	Coleta de material vegetal (<i>A. bilabiata</i>) no município de Autazes						R						
05	Preparo de material vegetal e obtenção de extratos				R	R	R	R					
06	Preparo do meio de cultura com os extratos vegetais				R	R	R	R					
07	Montagem do experimento				R	R		R	R	R			
08	Avaliação do crescimento e esporulação do patógeno				R	R	R	R	R	R			
09	Elaboração relatório parcial						R				R	R	R
10	Elaboração do resumo e relatório final										R	R	R
11	Preparação da apresentação final para o congresso											R	R