

Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*

Gilmar Franzener¹, José Renato Stangarlin^{1*}, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada² e Maria Eugênia Silva Cruz²

¹ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Pernambuco, 1777, C.P. 91, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasi. ²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: jrstangarlin@unioeste.br

RESUMO. Com o objetivo de se realizar o controle alternativo de *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo, extrato aquoso (EA) da planta medicinal *Artemisia camphorata* (cânfora) foi utilizado em bioensaios para avaliar seus efeitos fungitóxico (através da inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos) e indutor de resistência. Utilizou-se EA em concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%, autoclavado ou não, com ou sem adição de antioxidante (Na_2SO_3 - 0,25%). Para indução de resistência, plantas com 30 dias de idade receberam o EA através de aspersão e 24, 48 e 72 horas após os tratamentos, realizou-se a inoculação com uma suspensão de esporos do patógeno (1×10^4 conídios/ml). O extrato aquoso de cânfora a 50% causou a inibição de 39% do crescimento micelial, sendo que a 10% já inibiu completamente a esporulação. O EA não autoclavado inibiu 20% a germinação de esporos enquanto o EA autoclavado não causou inibição, indicando a presença de compostos fungitóxicos termolábeis. A incorporação de antioxidante ao EA favoreceu a inibição da germinação de esporos. O EA promoveu a indução de resistência sistêmica em plantas de trigo, reduzindo o tamanho (em até 29%) e, principalmente, o número de lesões (em até 60%), sendo observada maior inibição em plantas tratadas com o EA de cânfora 72 horas antes da inoculação com o patógeno. Estes resultados indicam o potencial do EA de *A. camphorata* no controle alternativo da mancha marrom do trigo.

Palavras-chave: resistência induzida, controle alternativo, cânfora, mancha marrom do trigo.

ABSTRACT. Fungitoxic activity and resistance induction in wheat plants against *Bipolaris sorokiniana* by *Artemisia camphorata*. Aqueous extract (AE) from medicinal plant *Artemisia camphorata* (camphor) was used to evaluate the fungitoxic activity (by inhibition of mycelial growth, sporulation and conidia germination of the pathogen) and the resistance induction, aiming to promote alternative control of *Bipolaris sorokiniana* on wheat. AE in autoclaved or non-autoclaved concentrations of 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 50% was prepared with or without antioxidant (Na_2SO_3 - 0.25%). To evaluate resistance induction, 30-day plants were sprayed with AE and 24, 48 and 72 hours after the treatments the leaves were inoculated with pathogen (1×10^4 conidia/ml). 50% AE caused 39% of mycelial growth inhibition. 10% AE inhibited the fungus sporulation *in vitro* totally. Non-autoclaved AE inhibited only 20% of conidia germination but the autoclaved AE did not cause inhibition showing the presence of thermo-sensible compounds. The incorporation of antioxidant Na_2SO_3 in AE increased the inhibition of conidia germination. The camphor AE also induced systemic resistance in wheat plants, reducing the size (up to 29%) and number of spots (up to 60%). The induction was higher in plants treated with camphor 72 hours before the inoculation with pathogen. These results confirm the potential of camphor AE in alternative control of black point wheat.

Key words: induced resistance, alternative control, camphor, black point wheat.

Introdução

Atualmente, em qualquer lugar do mundo onde se pratica agricultura econômica, a intervenção para o controle de doenças é largamente realizada através

de fungicidas. 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 isolados dos patógenos resistentes às

substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o ambiente podem se tornar negativos, devido a poluição causada pelos resíduos (Zadoks, 1992).

Neste contexto, surgem termos como o controle alternativo de doenças de plantas, no qual se destaca a indução de resistência. Esta envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas (Hammerschmidt e Dann, 1997). Esta ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos (como microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos. Moléculas de origem biótica ou abiótica capazes de ativar/induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamadas de eliciadores (Smith, 1996), podendo, neste caso, atuarem como indutores de resistência.

A resistência induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias são importantes no fenômeno da resistência induzida (Pascholati e Leite, 1995). A resistência induzida tem sido verificada em diversas plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (Schneider et al., 1996). Assim, a “imunização” de plantas mostra-se como uma estratégia potencial para o controle de fitopatógenos (Lyon et al., 1995). Numa visão geral do processo de resistência sistêmica induzida, o fenômeno pode ser comparado com a imunização de animais e de seres humanos em seus efeitos finais de proteção, ainda que os mecanismos sejam totalmente diferentes, em sua natureza (Romeiro, 1999).

Plantas medicinais possuem compostos secundários (compostos não vitais às plantas, mas com função de proteção contra pragas e doenças e atração de polinizadores) que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta), como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação antimicrobiana indireta). Na literatura é possível encontrar um grande número de trabalhos que utilizam as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários de plantas medicinais para o controle de agentes fitopatogênicos, utilizando o extrato bruto ou o óleo essencial dessas plantas (Stangarlin et al., 1999).

Neste sentido, algumas plantas se destacam, como é o caso da planta medicinal *Artemisia camphorata* Vill. (cânfora). As folhas dessa planta possuem 0,8% de óleo essencial constituído por mais de 60% do composto terpenóide linalol (Martins et al., 1995). Extrato bruto e óleo essencial de cânfora

têm mostrado resultados satisfatórios na inibição do crescimento micelial de alguns fungos (Soares et al., 1998a,b; Stangarlin et al., 1997), bem como na indução de fitoalexinas em sorgo e soja (Schwan-Estrada et al., 1997).

Na cultura do trigo, a ocorrência de doenças em nível de dano é muito freqüente, sendo que um dos fatores limitantes à produção, tanto no Paraná quanto nos estados vizinhos, é a presença da mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Mehta et al., 1996). Como consequência, o emprego de fungicidas na cultura é muito comum, elevando os custos de produção.

Embora alguns trabalhos indiquem o potencial de *A. camphorata* no controle alternativo de doenças, não se encontrou na literatura nenhuma referência sobre o uso de cânfora para controle de *B. sorokiniana* e/ou o potencial desta planta em induzir resistência em trigo. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do extrato bruto aquoso de *A. camphorata* sobre *B. sorokiniana* através da inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos e, também, avaliar o potencial deste extrato em induzir resistência em plantas de trigo a *B. sorokiniana*.

Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do *Campus* da Unioeste em Marechal Cândido Rondon, Estado do Paraná.

Obtenção do extrato bruto de *A. camphorata*

Para obtenção de extrato bruto aquoso (EA), folhas com dois meses de idade foram coletadas e trituradas em liqüidificador com água destilada por 1 min. O homogeneizado resultante foi filtrado em gaze e em papel de filtro Whatman nº 41. Em todos os ensaios foram utilizados extratos com ou sem autoclavagem e com ou sem adição de 0,25% de antioxidante sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3) (Franzener et al., 2001). Todos os tratamentos tiveram cinco repetições e todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Inibição do crescimento micelial e da esporulação

Extrato bruto aquoso de *A. camphorata* foi incorporado em meio de cultivo BDA (batata dextrose ágar) nas concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50 % e autoclavado a 120°C e 1 atm por 20min. Uma hora após o meio ter sido vertido em placas de Petri, um disco de 7mm de diâmetro contendo micélio de *B. sorokiniana*, com 14 dias de idade em BDA, foi transferido para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas no escuro a 25°C. O tratamento

controle teve apenas o meio BDA. As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), 24h após a instalação do experimento e perduraram até o momento em que as colônias atingiram 3/4 da superfície do meio de cultura (Stangarlin *et al.*, 1999).

Ao término deste bioensaio foi avaliada a esporulação de cada uma destas colônias. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos, obtida através da adição de 10mL de H₂O na placa, raspagem da colônia e filtragem em gaze, sendo determinado o número de conídios com auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico. Os resultados foram expressos em número de esporos/cm² de colônia.

Inibição da germinação de esporos

Para o teste de inibição, uma alíquota de 40μl de suspensão de esporos (1 x 10⁴ conídios/ml) e outra de 40μl de cada concentração de extrato bruto, autoclavado ou não, foram colocadas em cada um dos recipientes ("orifícios") de uma placa usada em teste de ELISA (Regente *et al.*, 1997). Essas placas foram incubadas no escuro a 25°C. Após 12 horas, a germinação foi paralisada com adição de 100μl de azul algodão de lactofenol e a porcentagem de esporos germinados determinada em microscópio ótico (Franzener, 2002).

Indução de resistência em trigo a *B. sorokiniana*

Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) foram cultivadas em copos plásticos (capacidade para 500mL) contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica autoclavados, e mantidas em condições ambientes. Utilizou-se como tratamentos H₂O + antioxidante (controle), extrato de cânfora (com antioxidante) a 10% e 20%, e o produto Bion (Acibenzolar-metílico), um ativador de resistência em plantas, na concentração de 200 ppm do produto comercial (Osswald *et al.*, 1998). A segunda folha verdadeira de plantas com 25 dias de idade receberam, através de aspersão, o extrato bruto de cânfora. Vinte e quatro, 48 e 72 horas após os tratamentos, a segunda folha tratada, bem como a terceira folha não tratada, foram inoculadas com o patógeno. As inoculações foram feitas utilizando-se inóculos de mesma idade (20 dias), através de um atomizador contendo uma suspensão de esporos de *B. sorokiniana* na concentração de 1 x 10⁴ conídios/ml (Triller e Mehta, 1997). Foi adicionada à suspensão de esporos o espalhante Tween-20 (uma gota por 200mL) (Mehta *et al.*, 1996). Após a inoculação, as plantas de trigo foram mantidas em câmara úmida por 15 horas e após esse período permaneceram em

casa de vegetação. O tamanho e o número de lesões foram avaliados 10 dias após a inoculação.

Para facilitar a interpretação dos resultados, foi realizada análise de variância e teste de Tukey para comparar as médias dos ensaios com auxílio dos programas de computador SAEG, para os resultados da germinação de esporos, e ESTAT para os demais resultados, sendo os dados de esporulação e do número de lesões transformados para $\sqrt{x+\alpha}$.

Resultados e discussão

Inibição do crescimento micelial e da esporulação

O extrato aquoso de cânfora promoveu redução no crescimento micelial de *B. sorokiniana*, sendo verificada, também, dependências nas concentrações utilizadas pela ocorrência de regressão quadrática significativa a 1% ($Y=0,77007380E+02+0,1309057E+01X+0,1374668E-01X^2$ $R^2=0,9858$) sendo este efeito crescente com o aumento da concentração do extrato incorporado no meio de cultivo (Tabela 1). Além disso, o extrato provocou alterações na morfologia das colônias, sobretudo na cor, pois se apresentaram escuras, quase pretas, em BDA, e assumiram coloração esbranquiçada com o aumento da concentração de extrato incorporado.

Tabela 1. Inibição *in vitro* do crescimento micelial e da esporulação de *Bipolaris sorokiniana* em função do tratamento com extrato bruto aquoso autoclavado de *Artemisia camphorata* (cânfora)

Tratamentos	Inibição (%)	
	Crescimento micelial	Esporulação
Controle (BDA)	0	0
Extrato de cânfora 1%	0	0
Extrato de cânfora 5%	9	80
Extrato de cânfora 10%	13	100
Extrato de cânfora 15%	19	100
Extrato de cânfora 20%	25	100
Extrato de cânfora 25%	31	100
Extrato de cânfora 50%	39	100

A inibição do crescimento micelial não foi considerada muito elevada, pois inibições maiores têm sido observadas em ensaios com cânfora e *Colletotrichum graminicola* (Stangarlin *et al.*, 1997), ou utilizando outros extratos no controle de *B. sorokiniana* (Bernardo *et al.*, 2001).

A esporulação de *B. sorokiniana* em BDA apresentou valores em torno de 2 x 10⁴ conídios/cm² de colônia. Na presença de 1% do extrato de cânfora não se observou alteração significativa nestes valores, porém, o extrato a 10% já inibiu completamente a esporulação do patógeno *in vitro*.

Inibição da germinação de esporos

No tratamento controle a porcentagem de germinação de esporos de *B. sorokiniana* foi de 95%,

indicando a viabilidade dos conídios utilizados no ensaio. O efeito antifúngico direto do extrato aquoso de cânfora sobre a germinação de esporos foi grandemente afetado quando o mesmo foi autoclavado, pois não inibiu a germinação de esporos (Tabela 2), indicando, possivelmente, a presença de um composto fungitóxico termolábil. Já nos tratamentos não autoclavados e sem antioxidante houve inibição máxima de 11% da germinação. Porém, com antioxidante, a inibição máxima foi de 20%, sendo observada, principalmente, redução no desenvolvimento dos tubos germinativos em relação aos demais tratamentos.

Tabela 2. Inibição *in vitro* da germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana* em função do tratamento com extrato bruto aquoso de *Artemisia camphorata* (cânfora), autoclavado ou não autoclavado e contendo ou não antioxidante

Tratamentos	Inibição da germinação (%)			
	Com antioxidante		Sem antioxidante	
	Autoclavado	Não autoclavado	Autoclavado	Não autoclavado
Controle (H ₂ O)	0	0 a ³	0	0 a
EA 1% ²	0	2 b	0	1 a
EA 15% ²	0	14 c	0	6 b
EA 25% ²	0	20 d	0	11 c

¹Antioxidante: 0,25% de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₃); ²Concentração do extrato bruto aquoso (EA) de *A. camphorata*; ³Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 1\%$)

Estes resultados mostram que possíveis oxidações ocorridas com o extrato aquoso de cânfora, em seu processamento, podem afetar seu potencial fungitóxico (Franzener et al., 2001).

Indução de resistência

Conforme metodologia descrita, avaliou-se o número e o tamanho de lesões, porém, apenas foi possível a avaliação da terceira folha (não tratada), pois as folhas tratadas (segunda folha) já estavam em senescência no período da avaliação. Observou-se que maior inibição no número de lesões (Tabela 3) foi obtido com o extrato de cânfora a 20%, com diferença significativa em relação ao controle já no intervalo de 24 horas entre a indução e a inoculação. Nos intervalos de 48 e 72 horas a redução no número de lesões foi ainda mais expressiva. Bion e EA 10% reduziram significativamente o número de lesões somente no intervalo de 72 horas, indicando a exigência de maior período de tempo para ativação dos mecanismos de defesa da planta.

Conforme Pascholati e Leite (1995), a resistência induzida exige mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, por isso, então, é dependente do intervalo de tempo entre o

tratamento indutor e a subsequente inoculação do patógeno.

Tabela 3. Número médio de lesões/folha de plantas de trigo em função do tratamento com extrato aquoso de cânfora e Bion em diferentes intervalos antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo

Tratamentos	Número de lesões/folha ¹		
	Intervalo (em horas) do tratamento a inoculação		
	24	48	72
Controle (H ₂ O)	2,2 a ³	2,1 a	3,0 a
Bion (200 ppm)	1,9 ab	1,9 a	1,8 b
EA 10% ²	1,7 ab	1,8 a	1,8 b
EA 20% ²	1,6 b	1,2 b	1,2 c

¹Número de lesões avaliado na 3ª folha; tratamento com indutor realizado na 2ª folha;

²Concentração do extrato bruto aquoso (EA) de *A. camphorata*; ³Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 1\%$)

Em relação ao tamanho das lesões (Tabela 4), houve a mesma tendência do número de lesões, pois o extrato de cânfora, sobretudo a 20%, causou sensível redução no tamanho das lesões. No entanto, neste caso, não se verificou interação entre os tratamentos e os intervalos de tratamento, mas apenas entre as médias dos tratamentos. Houve diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, sendo que o EA 20% reduziu significativamente o tamanho das lesões em relação ao controle e ao Bion.

Tabela 4. Tamanho médio de lesões em função do tratamento com extrato aquoso de cânfora e Bion em diferentes intervalos antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo

Tratamentos	Tamanho das lesões (mm) ¹			
	Intervalo (em horas) do tratamento a inoculação			
	24	48	72	Média
Controle (H ₂ O)	1,5	1,7	1,4	1,50 a ³
Bion	1,4	1,5	1,5	1,42 ab
EA 10% ²	1,4	1,2	1,2	1,20 bc
EA 20% ²	1,1	1,1	1,0	1,07 c

¹Tamanho de lesões avaliado na 3ª folha; tratamento com indutor realizado na 2ª folha;

²Concentração do extrato bruto aquoso (EA) de *A. camphorata*; ³Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 1\%$)

Estes resultados indicam o potencial de *A. camphorata* no controle alternativo da mancha marrom do trigo e, possivelmente, de outras enfermidades de plantas, pois, além de apresentar efeito fungitóxico direto sobre *B. sorokiniana* é capaz de induzir resistência sistêmica em plantas de trigo. Trabalhos futuros envolvendo o fracionamento e a caracterização dos componentes desse extrato poderão contribuir para a melhor elucidação do fenômeno.

Referências

BERNARDO, R. et al. Efeito de extratos cítricos na indução de resistência e no crescimento micelial de fungos

- fitopatogênicos. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.26 (suplemento) p. 313, 2001.
- FRANZENER, G. *et al.* Potencialização da atividade fungitóxica e elicitora de fitoalexinas do extrato aquoso de cânfora com a incorporação de antioxidante. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v.27, no.1, p. 103-104, 2001.
- FRANZENER, G. *Atividade antifúngica, produção de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em trigo a Bipolaris sorokiniana a partir da planta medicinal Artemisia camphorata (cânfora)*. 2002. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2002.
- HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.) *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Boca Raton: CRC - Lewis Publishers. 1997. p. 177-199.
- LYON, G. D. *et al.* Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathol.*, London, v.44, p. 407-427, 1995.
- MARTINS, E. R., *et al.* *Plantas medicinais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 1995.
- MEHTA, Y. R. *et al.* Resistência genética de cultivares de trigo a *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.21, p. 455-459, 1996.
- OSSWALD, W. *et al.* Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em resposta ao tratamento com o ativador de defesa vegetal Bion. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.23 (suplemento), p. 266. 1998.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. p. 417-454.
- REGENTE, M. C. *et al.* A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.100, p. 178-182, 1997.
- ROMEIRO, R. S. *Indução de resistência em plantas a patógenos*. Viçosa: UFV, 1999.
- SCHNEIDER, M. *et al.* Systemic acquired resistance in plants. *Int. Rev. Cytol.*, San Diego, v.168, p. 303-340, 1996.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *et al.* Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.22 (suplemento), p. 346, 1997.
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, v.132: p. 1-45, 1996.
- SOARES, R. N. *et al.* Potencial de *Artemisia camphorata* (cânfora) no controle de *Sclerotium rolfsii* em casa-de-vegetação. In: VII ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1998, Maringá, Anais...Maringá, 1998a. p. 557.
- SOARES, R. N. *et al.* Potencial de *Artemisia camphorata* (cânfora) no controle de fungos fitopatogênicos. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.23 (suplemento), p. 284, 1998b.
- STANGARLIN, J. R. *et al.* Efeito de frações fungitóxicas de extrato bruto de plantas medicinais no crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.22 (suplemento), p. 346. 1997.
- STANGARLIN, J. R. *et al.* Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v.11, p. 16-21, 1999.
- TRILLER, C.; MEHTA, Y. R. Efeito da idade da folha bandeira de trigo na expressão de resistência a *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.23, p.167-169, 1997.
- VIGO, S.C. *et al.* Indução de gliceolina em soja e inibição da germinação de conídios de *Microsphaera diffusa* pela tintura vegetal de *Pfaffia glomerata*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 351, 2001. (Resumo n.311).
- ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. *J. Plant Prot. Trop.*, Kuala Lumpur, v.9, p.151-159, 1992.

Received on October 14, 2002.

Accepted on July 22, 2003.