

Avaliação de extratos vegetais no manejo da queima-das-folhas-do-inhame

Everton Sebastião do Nascimento¹, Marissônia de Araujo Noronha², André Felipe Câmara Amaral³

Resumo - A queima-das-folhas do inhame é a principal doença da cultura, cujo agente causal é o fungo *Curvularia eragrostidis*. Na busca por medidas de controle que sejam capazes de reduzir a doença sem causar impactos ambientais, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de extratos vegetais no manejo alternativo da queima-das-folhas do inhame. Foram realizados quatro ensaios com os extratos de graviola, mulungu, pinha e velame, onde se variou o modo de preparo, concentrações e diluições dos mesmos. Os extratos foram adicionados ao meio de cultura BDA, o qual foi vertido em placas de Petri que receberam um disco contendo crescimento de *C. eragrostidis*. A testemunha consistiu no crescimento do fungo em placas contendo apenas o meio de cultura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com quatro repetições, representada por uma placa de Petri. As avaliações do crescimento micelial e da esporulação de *C. eragrostidis* foram realizadas, respectivamente, diariamente até o oitavo dia e após 15 dias. Apenas os extratos de velame nas concentrações de 50% e 100% e diluição de 1 ml reduziram significativamente ($P \leq 0,05$) o crescimento micelial e a esporulação de *C. eragrostidis*. A realização de mais estudos que validem este resultado, assim como a avaliação da eficiência de outros extratos vegetais se faz necessária.

Termos para indexação: *Curvularia eragrostidis*, *Dioscorea cayenensis*, manejo alternativo.

Introdução

O inhame (*Dioscorea cayenensis* Lam.) é a espécie que predomina nas áreas de cultivo desta olerícola na região Nordeste (Santos; Macêdo, 2002). Nesta região os cultivados são realizados em unidades de produção familiar, que geram emprego e renda, sendo os estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Maranhão, os principais produtores (Brito et al., 2011).

Apesar da importância que o inhame representa para o Nordeste, tem ocorrido uma acentuada redução da área plantada, de aproximadamente 40%, acompanhado de redução de 23% a 56% na produção (Oliveira et al., 2012). Estima-se que nas áreas produtoras de inhame a produtividade média da cultura é considerada baixa, cerca de 10.647 kg/ha (Santos; Macêdo, 2002). Dentre os fatores responsáveis por esta baixa produtividade, está a elevada intensidade de doenças, com destaque para a queima-das-folhas-do-inhame, também denominada de pinta-preta cujo agente etiológico é o fungo *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer [teleomorfo *Cochliobolus eragrostidis* Tsuda & Ueyama] (Michereff; Noronha; Maffia, 2008).

Os sintomas de queima-das-folhas-do-inhame podem ocorrer nos ramos, pecíolos e folhas da planta, onde se observam manchas foliares necróticas, com formato tendendo para circular, de coloração marrom-escuro, com centro claro e, frequentemente circundadas por um halo amarelo. A coalescência dessas manchas foliares induz a formação de grandes áreas necrosadas, e conseqüentemente, a presença de folhas retorcidas, que caem facilmente. Quando a severidade da doença é alta no início do ciclo vegetativo, pode levar a intensa desfolha da planta de inhame, o que compromete o desenvolvimento das túberas comerciais e túberas sementes (Moura, 2005).

Considerando que a produção de inhame na região Nordeste se caracteriza por pequenas áreas de cultivo, com utilização de mão de obra familiar e baixa adoção de insumos agrícolas, o manejo ecológico da queima das folhas, representa uma ferramenta que pode ser adotada visando uma redução dos danos causados por esta doença.

Resultados promissores têm sido obtidos por meio de estudos in vitro e in vivo com relação à eficácia de produtos alternativos, como os extratos de alho (*Allium sativum* L.), de citronela (*Cymbopogon nardus* (D.C.) Stapf), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e de folhas de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) (Almeida et al., 2013; Brito; Nascimento, 2015; Santos; Carvalho; Lacerda, 2008). Contudo, a pesquisa por substâncias com ação fungicida oriundas de produtos naturais se constitui numa estratégia que deve ser ininterruptamente considerada, desenvolvida e aprimorada (Carvalho et al., 2002).

Na busca por novas comprovações científicas quanto a alternativas de controle ecologicamente viáveis, este trabalho teve como objetivo a avaliar o efeito de extratos vegetais no manejo alternativo da queima das folhas do inhame.

¹Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

²Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

³Químico, mestre em Química Orgânica Analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

Material e Métodos

1. Obtenção dos materiais vegetais e do fungo *Curvularia eragrostidis*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Rio Largo, AL. As folhas de velame (*Croton* sp.) e mulungu (*Erythrina* sp.) foram coletadas no município de Paulo Jacinto (S 09°20.697'; O 36°21.486') e as de gravioleira (*Annona muricata* L.) e pinheira (*A. squamosa* L.) em Rio Largo (S09°20.697'; O36°21.486'), estado de Alagoas.

O isolado de *C. eragrostidis* utilizado nos ensaios foi obtido a partir de folhas de inhame com sintomas de queima-das-folhas, sendo a coleta realizada no município de Taquarana (S09°39.589'; O36°27.337'), AL.

2. Avaliação da eficiência de extratos de vegetais na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Curvularia eragrostidis*

2.1. Ensaio I - Obtenção do extrato de velame por métodos de esterilização

Folhas de velame foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar (60 °C) e trituradas em liquidificador. No preparo dos extratos adotou-se a proporção de 100 g de material vegetal e 1000 mL de água destilada esterilizada (ADE), sendo inicialmente preparado um chá por infusão das folhas trituradas em ADE por 24 horas. Após esse período o chá e um extrato, imediatamente preparado, foram filtrados em papel Whatman nº 01 com o auxílio de uma bomba de sucção. Parte dos extratos feitos a partir do chá e da filtragem imediata (EFI), assim como folhas de velame trituradas foram autoclavados por 5 min. a 120 °C. Outra parte do extrato (EFI) foi submetida ao banho-maria nas temperaturas de 60 °C e 80 °C por 30 min. Um tratamento obtido do extrato de chá não foi exposto a processos de esterilização. Com as folhas de velame esterilizadas elaborou-se outro extrato pela adição de ADE.

Para realização do ensaio foram preparadas quatro concentrações dos tratamentos (25%, 50%, 75% e 100%), sendo adicionado ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) fundente (± 45 °C) 0,5 ml de cada concentração, que após homogeneizado foi vertido em placas de Petri. No centro de cada placa foi colocado um disco (4mm) contendo crescimento de *C. eragrostidis*. A testemunha consistiu da presença do fungo em placas contendo apenas o meio BDA. Os tratamentos foram mantidos em incubadora tipo BOD sob temperatura de 27 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 24h até o oitavo dia pela mensuração do diâmetro das colônias em dois sentidos opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada.

2.2. Ensaios II, III e IV - Obtenção dos extratos de gravioleira, mulungu, pinheira e velame com esterilização por membrana

Visando excluir o efeito de uma possível termosensibilidade dos compostos bioativos, foram elaborados extratos aquosos de folhas frescas de velame e mulungu na proporção de 1:3, sendo a filtragem realizada conforme o item 2.1. Extratos orgânicos foram obtidos de folhas de velame secas e trituradas, onde adicionou-se os solventes acetona, etanol e hexano na proporção de 1:10, os quais permaneceram sob agitação por 72 h, seguido de filtração e evaporação dos solventes em capela de exaustão.

Após a obtenção dos extratos aquosos diluídos na concentração de 50% e 100% e orgânicos a 100%, procedeu-se a esterilização de 1 ml de cada tratamento em milipore (0, 20 μ m), o qual foi adicionado ao meio de cultura BDA fundente. Os demais procedimentos incluindo as avaliações foram semelhantes ao descrito no item 2.1

No terceiro ensaio foram elaborados extratos aquosos na proporção de 1:3 de folhas frescas de gravioleira e velame e de 1:7 para pinheira, sendo a filtragem realizada conforme descrito anteriormente. Os extratos foram utilizados na concentração de 100%, procedendo-se a esterilização das diluições de 2,5 mL e 5 mL dos tratamentos de gravioleira e velame em milipore, não sendo possível esterilizar o extrato de pinheira devido as suas características físico-químicas.

Com o objetivo de validar os resultados obtidos no item 3.2.2 se avaliou os extratos de velame nas concentrações de 50% e 100%, realizando-se por meio do milipore a esterilização das diluições de 1 mL e 2,5 mL. O extrato de pinheira foi elaborado na proporção de 1:5 a 100%, com filtragem em membrana de 0,50 μ m. Nos ensaios III e IV, após os extratos serem adicionados ao meio de cultura BDA fundente, seguiu-se os mesmos procedimentos efetuados no item 2.1. Embora tenha sido estimada a produção de esporos em ambos os ensaios, não foi possível efetuar a análise dos dados, pois a testemunha apresentou baixa esporulação.

A produção de conídios em cada tratamento foi estimada após 15 dias de incubação do fungo, por meio de uma suspensão preparada pela deposição de 10 mL de ADE em cada placa de Petri e filtragem em dupla camada de gaze esterilizada. A estimativa concentração de conídios de *C. eragrostidis* foi realizada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, sendo realizadas três leituras por repetição.

Em todos os ensaios o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (concentrações x diluições x extratos), com quatro repetições, representada por uma placa de Petri. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi obtida por meio da fórmula: $PIC = [(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha. Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância e para o caso de diferenças significativas entre os tratamentos aplicou-se o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As análises foram efetuadas com o auxílio do programa SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Os extratos de velame elaborados no primeiro ensaio não foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. eragrostidis* e/ou apresentaram contaminações nas placas de Petri que impediram de efetuar avaliações. Esta última situação também ocorreu em tratamentos dos outros ensaios.

De acordo com a análise de variância realizada para os ensaios II, III e IV, constataram-se diferenças significativas ($P \geq 0,01$) para o efeito dos extratos de vegetais na inibição do crescimento micelial e esporulação de *C. eragrostidis*. Entre os extratos de velame utilizados, os aquosos nas concentrações de 50% e 100% apresentaram a maior inibição do crescimento micelial com 15,63% e 12,33% e menor esporulação, com 8,72 e 4,42 x 10⁵ conídios/ml, respectivamente, não havendo diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre eles. Não houve efeito dos extratos orgânicos no desenvolvimento vegetativo de *C. eragrostidis* (Tabela 1).

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nos ensaios III e IV, onde se verifica que apenas o extrato de velame na concentração de 100% e diluição de 1 ml foi capaz de inibir o crescimento micelial do patógeno, diferindo significativamente dos demais tratamentos e validando o resultado observado no ensaio II. Embora o efeito no desenvolvimento vegetativo do fungo tenha sido pequeno nos dois ensaios, o extrato de velame foi capaz de reduzir em 90,66% a esporulação de *C. eragrostidis*, quando comparado com a testemunha (Tabelas 1 e 2), interferindo assim na sua fase reprodutiva.

O efeito de extratos de velame com ação sobre patógenos de plantas não foram encontrados na literatura pesquisada. Matias et al. (2010) destaca que extratos metanólicos e hexânicos de velame-do-campo (*C. campestris* A.) demonstraram ser uma promissora fonte de pesquisa na área de produtos naturais com ação antibacteriana. Um estudo in vitro sugere a eficiência do extrato de *C. campestris* na modulação da resistência microbiana a eritromicina. O autor inferiu que o extrato poderia facilitar a entrada do antibiótico na célula bacteriana, inibindo a ação de enzimas que o inativem ou bloqueando mecanismos que expulsem o fármaco do interior da célula (Barbosa, 2014).

Tabela 1. Efeito de extratos de folhas de velame na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Curvularia eragrostidis*.

Extratos	Inibição do crescimento micelial (%)	Esporulação (x10 ⁵ con/ml)
Velame 50%	15,63 a ⁽¹⁾	8,72 a ⁽²⁾
Velame 100%	12,33 a	4,42 a
Velame hexano	1,48 b	39,81 b
Velame acetona	1,48 b	54,50 b
Velame etanol	1,15 b	51,95 b
Testemunha	0,00 b	47,33 b
CV(%)	32,48	24,37

⁽¹⁾Médias originais de quatro repetições. Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ para realização da análise de variância. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾Médias originais de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tabela 2. Efeito de extratos de folhas velame e gravioleira na inibição do crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis*.

Extratos	Inibição do crescimento micelial (%)
Velame 100% (1,0) ⁽²⁾	8,39 a ⁽¹⁾
Velame 50% (1,0)	2,47 b
Velame 100% (2,5)	2,37 b
Graviola (2,5)	1,15 b
Graviola (5,0)	0,98 b
Velame 100% 2,5	0,00 b
Testemunha	0,00 b
CV(%)	36,35

⁽¹⁾Médias originais de quatro repetições. Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ para realização da análise de variância. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾Números entre parênteses correspondem as diluições em ml das concentrações dos extratos no meio de cultura.

Com relação à eficiência de extratos vegetais sobre *C. eragrostidis*, resultados preliminares, in vitro, utilizando extratos de alho, capim citronela, gengibre e nim na concentração de 25% mostraram efeito fitotóxico sobre o patógeno (Brito; Nascimento, 2015).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a escolha do método de obtenção do extrato pode interferir na sua eficácia. Leme et al. (2007) verificaram que a forma de esterilização e o tempo de armazenamento do extrato de capim-limão interferiram na atividade do mesmo em relação ao desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Portanto, é importante a realização de mais ensaios que possam aferir o potencial de outros extratos vegetais e métodos de extração.

Conclusões

O extrato de velame na concentração de 100% e diluição de 1 ml reduziu o crescimento micelial e a esporulação de *C. eragrostidis*. Contudo, mais estudos se fazem necessários, uma vez que a eficiência do extrato só ficou mais evidente na fase de reprodução do fungo.

Referências

- ALMEIDA, D. O. C.; SOUZA, J. T.; MOREIRA, R. F. C. Uso de extratos vegetais na proteção de plantas de inhame contra *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. **Agrotropica**, v. 25, n. 3, p. 187-198, 2013.
- BARBOSA, A. S. **Atividade moduladora de extratos de plantas medicinais sobre a resistência de cepas de Staphylococcus aureus à eritromicina**. 2014. 19 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia)-Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, João Pessoa, 2014.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 2, p. 230-238, 2015.
- BRITO, T. T.; SOARES, L. S.; FURTADO, M. C.; CASTRO, A. A.; CARNELOSSI, M. A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado, **Scientia Plena**, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2011.
- CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, S. S. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- LEME, M. I. S.; CAMARGO, M.; FURLANI, A. C. F. A.; PANIZZI, R. C.; LEITE, R. F.; ROSA, J. Efeito in vitro de capim-limão no desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 92, 2007. Suplemento.
- MATIAS, E. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana in vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.
- MICHEREFF, S. J.; NORONHA, M. A.; MAFFIA, L. A. Sample size for assessment of yam leaf blight severity. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 189-191, 2008.
- MOURA, R. M. Doenças do Inhame-da-Costa. In: AMORIM et al. Manual de Fitopatologia / Doenças das Plantas Cultivadas. 5 ed. Ouro Fino - MG: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 477 – 483, 2016.
- OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D. F.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, A. N. P.; SANTOS, R. R.; SILVA, N. V.; OLIVEIRA, F. J. M. Tecnologia alternativa para produção de túberas-semente de inhame e seus reflexos na produtividade. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 553- 556, 2012.
- SANTOS, E. S.; CARVALHO, R. A.; LACERDA, J.T.; Alternativas naturais e ecológicas no controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* spp.). **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2008.
- SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. Tendências e perspectiva da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB.2002.