

**Efeito de produtos naturais na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi***

Effect of natural products on induction of phytoalexins in soybean and the germination of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores

MESQUINI, R.M. Universidade Estadual de Maringá-PR, rmesquini@gmail.com; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Universidade Estadual de Maringá-PR; NASCIMENTO, J.F. Universidade Federal de Roraima-RR. BALBI-PEÑA, M.I. Universidade Estadual de Maringá-PR. BONALDO, S.M. Faculdade Integrado de Campo Mourão-PR

**Resumo:** O uso indiscriminado de agrotóxicos tem causado danos ao meio ambiente e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a estas substâncias químicas. O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial de grãos de kefir autoclavado sequencialmente e hidrolato de eucalipto autoclavado ou não na indução de fitoalexinas em soja. Foi estudado também o potencial do extrato bruto (EB) de *Eucalyptus citriodora* (1%, 5% e 20%), biomassa cítrica (Ecolife®) (100, 1000 e 5000 ppm), grãos de kefir (20%) autoclavado 60 minutos sequencialmente e não autoclavado, sobre a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Para fitoalexinas em cotilédones de soja, o maior acúmulo foi observado no EB de grãos de kefir autoclavado sequencialmente por 20 minutos, e hidrolato autoclavado. O teste de germinação *in vitro*, foi realizado em placas de Elisa, com 10µL da suspensão de 1x10<sup>5</sup> urediniósporos/mL e 50µL de cada um dos tratamentos. Todos os produtos testados foram eficientes em relação ao controle (85 a 98% de inibição). Pode-se inferir que os produtos naturais testados indicam a presença de compostos indutores de fitoalexinas e têm efeito direto na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* tendo então potencial para uso no controle da ferrugem da soja em sistemas agroecológicos.

**Palavras-chave:** controle alternativo, fitoalexinas, ferrugem da soja.

**Abstract:** The indiscriminate use of chemicals in agriculture have damaged the environment and caused selection of resistant pathogenic races. The objective of this study was to determinate the potential of sequentially autoclavated kefir grains and eucalyptus hidrolate (autoclaved and not autoclaved) in the induction of soybean phytoalexins. The potential of aqueous extracts of *Eucalyptus citriodora* (1%, 5% and 20%), citric biomass (Ecolife®) (100, 1000 and 5000ppm) and kefir grains (20%) sequentially autoclaved for 60 min and not autoclaved on the urediniospore germination of *P. pachyrhizi* was also studied. The highest accumulation of phytoalexins in soybean cotyledons was observed in aqueous extract of kefir grains sequentially autoclaved for 20 minutes and autoclavated hidrolate treatment. The *in vitro* germination test of urediniospores was performed in Elisa plates with 10µL of an 1x10<sup>5</sup> urediniospores/mL suspension of each treatment. All products tested were efficient to inhibit urediniospore germination compared with the check (85-98%). These results suggest that these natural products have phytoalexin inducing compounds and exhibit a direct effect on *P. pachyrhizi* urediniospore germination, showing potential to control soybean rust in agroecological systems.

**Key words:** alternative control, phytoalexins, soybean rust.

## Introdução

A aplicação indevida de agrotóxicos traz conseqüências danosas ao meio ambiente, com contaminação da flora e do solo e seleção de patógenos resistentes a esses produtos. Essa situação tem motivado a busca de medidas alternativas que

enfocam melhor as condições ecológicas e sociais. As agriculturas de base ecológica surgem com o objetivo de enfrentar os problemas causados pela agricultura moderna convencional. A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é considerada a mais importante fonte de proteína e de óleo vegetal no mundo e seu cultivo é basicamente no sistema convencional. Entre os fatores que contribuem para a variação no rendimento da cultura nas diversas regiões estão as doenças. Entre elas destaca-se a ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow que tem causado reduções de rendimento de 10 a 90% (GODOY & CANTERI, 2004). Sendo seu controle realizado com fungicidas. Entretanto, visando atender principalmente aos produtores dos sistemas de produção agroecológicos, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos de controle. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito de produtos naturais na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* e na indução da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja.

### **Material e métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Fitopatológica da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições em todos os experimentos realizados.

#### **a) Produtos naturais utilizados:**

Grãos de kefir: foram cultivados em água e açúcar mascavo e “alimentados” a cada 24 horas. O extrato bruto aquoso consistiu em 20g de grãos de kefir em 100mL de água destilada esterilizada. Foi utilizado autoclavado sequencialmente por 60 minutos e não autoclavado.

Hidrolato da planta medicinal de Eucalipto: obtido por sistema de extração de óleo essencial por arraste a vapor sendo separado através de decantação e mantido em garrafas plásticas (pet) até a utilização nos ensaios. Utilizou-se 20mL diluído em água. Foi autoclavado por 20 min, e não autoclavado (padrão).

Extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*: para a obtenção do extrato bruto com 20, 5 e 1% (p/v) de material vegetal, folhas frescas de *E. citriodora* foram coletadas e trituradas em liquidificador com água destilada. O extrato não foi autoclavado.

Biomassa Cítrica: Foi utilizado o produto comercial Ecolife® nas concentrações: 100, 1000 e 5000ppm.

b) Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Cotilédones de soja foram cortados em secção aproximada de 1mm de espessura e 6mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Cada cotilédone recebeu 75µL de cada tratamento: grãos de kefir sem autoclavar e autoclavado por 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos sequencialmente, hidrolato de eucalipto não autoclavado e autoclavado (120°C, 1 atm por 20 min) e água esterilizada (controle). As placas de Petri foram mantidas no escuro a 25°C. Após 20 h, as gliceolinas foram extraídas utilizando-se 15ml de água destilada esterilizada. A absorbância foi determinada a 285nm

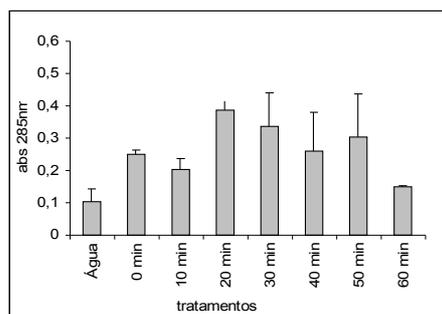
c) Efeito *in vitro* sobre a germinação de urediniósporos *P. pachyrhizi*.

Alíquota de 10µL da suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  urediniósporos/mL) de *P. pachyrhizi* e 50µL de cada tratamento: grãos de kefir não autoclavado e autoclavado por 60 min, extrato bruto de eucalipto (1, 5 e 20%), Ecolife (100, 1000 e 5000ppm), foram colocadas em “pocinhos” de placa ELISA e incubadas no escuro a 25°C por 4h. Após este período foi realizada a avaliação pela contagem do número médio de esporos germinados ou não, ao microscópio ótico. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentavam tubo germinativo no início da emissão. Neste bioensaio utilizou-se como controle água destilada esterilizada.

## Resultados e discussão

### Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

O extrato bruto de grãos de kefir induziu a síntese de gliceolinas, em todos os tempos testados. No entanto, quando submetido a autoclavagem, houve aumento na produção de gliceolina, com um máximo no kefir autoclavado 20 minutos sequencialmente (Figura 1). Este resultado mostra que esse extrato bruto apresenta alterações quando submetido ao tratamento térmico o que altera a produção das fitoalexinas. Com relação à produção de gliceolinas por hidrolato de eucalipto, observa-se que só houve indução quando este foi autoclavado. O efeito indutor de fitoalexinas verificado nos bioensaios com cotilédones de soja indica que o EB de grãos de kefir e hidrolato de eucalipto apresentam capacidade de ativar mecanismos de defesa nessa planta.



**Figura 1.** Indução de fitoalexinas por grãos de kefir autoclavado seqüencialmente.

#### Efeito *in vitro* sobre germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Verificou-se que extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* (1%, 5% e 20%), biomassa cítrica - Ecolife® (100, 1000 e 5000ppm), grãos de kefir (20%), autoclavado 60 minutos seqüencialmente, e não autoclavado interferiram na germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* (Tabela 1). Estes dados mostram que todos os tratamentos utilizados apresentaram efeito direto sobre o fungo.

**Tabela 1.** Efeito de grãos de Kefir (não autoclavado e autoclavado seqüencialmente por 60 min), extrato bruto (EB) de eucalipto (1, 5 e 20%), biomassa cítrica (100, 1000 e 5000ppm) na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

Tratamentos	Não germinados (%) <sup>1</sup>	Germinados (%)
Grãos de kefir não autoclavado	87 b	13
Grãos de kefir autoclavado por 60 min	95 b	5
EB eucalipto1%	95 b	5
EB eucalipto5%	82 b	18
EB eucalipto 20%	92 b	8
Ecolife 100 ppm	98 b	2
Ecolife 1000 ppm	89 b	11
Ecolife 5000 ppm	94 b	6
Água	15 a	85

<sup>1</sup> Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knot

#### Referências bibliográficas

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeito da severidade de oídio e crestamento foliar de cercospora na produtividade da cultura da soja. Fitopatologia Brasileira, v.29, p.526-531, 2004.