

## Controle Alternativo de *Aspergillus niger* em Sementes de Zarcilito com Licor Pirolenhoso de Timburi *in vitro*

*Alternative control of Aspergillus niger in seed of Zarcilito with pyrolignous of the Timburi in vitro*

SORATO, Adriana Matheus da Costa<sup>1</sup>; MALACARNE, Jean Gibson<sup>1</sup>, DAVID, Grace Queiroz<sup>1</sup>; PERES, Walmor Moya<sup>1</sup>, MATOS, Dilânia Lopes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, [adrianasorato@unemat.br](mailto:adrianasorato@unemat.br); [jeanmalacarne@gmail.com](mailto:jeanmalacarne@gmail.com); [gracequeirozdavid@hotmail.com](mailto:gracequeirozdavid@hotmail.com); [walmorperes@hotmail.com](mailto:walmorperes@hotmail.com); [dilan\\_lopes@hotmail.com](mailto:dilan_lopes@hotmail.com);

**Resumo:** O objetivo desse trabalho foi analisar o uso do licor pirolenhoso de Timburi (*Enterolobium contortisiliquum*) na inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* em sementes de *Cojoba sophorocarpa*. Foi instalado experimento em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (1: água destilada esterilizada + BDA; 2: licor pirolenhoso a 1% + BDA, 3: licor pirolenhoso a 10% + BDA; 4: licor pirolenhoso a 20% + BDA) e cinco repetições. As variáveis analisadas foram crescimento micelial (CMM), índice de velocidade de crescimento (IVCM) e a porcentagem de inibição do crescimento (PIC). Os menores valores de crescimento micelial (CMM) ocorreram para as concentrações a 10% e a 20% de licor pirolenhoso, os quais apresentaram valores de 1,12 e 0,0 CMM. Para a maior concentração de licor pirolenhoso ocorreu o menor IVCM (0,0), quando o mesmo foi comparado a testemunha (7,09). Ocorreu inibição de crescimento total de *Aspergillus niger* para a concentração de 20% de licor, e inibição de 97,02% de crescimento para 10% de licor. Existem efeitos promissores de licor pirolenhoso de Timburi como inibidor de fungos.

**Palavras-chave:** *Cojoba sophorocarpa*, *Enterolobium contortisiliquum*, regressão linear.

**Abstract:** The objective of this study is to analyze the use of pyrolignous the Timburi (*Enterolobium contortisiliquum*) as an alternative method aimed at inhibiting the mycelial growth of the fungus *Aspergillus niger* in seed *Cojoba sophorocarpa*. An experiment was performed in completely randomized design with four treatments (1: sterile distilled water+ BDA; 2: pyrolignous 1% + BDA, 3: pyrolignous 10% + BDA; 4: pyrolignous 20% + BDA) and five repetitions. The variables analyzed were mycelial growth, the growth rate (IVCM), and the percentage of growth inhibition (PIC). The lowest values of mycelial growth medium (CMM) occurred at concentrations of 10% and 20% of pyrolignous, which showed values of 1.12 and 0.0 CMM. For the higher concentration of pyrolignous is the lowest IVCM (0,0), when it is compared to control (7,09). Total growth inhibition occurs from *Aspergillus niger* to 20% concentration liquor, and almost complete growth inhibition (97.02%) to a concentration of 10%. There are promising effects of *Timburi pyroligneous* liquor to control fungus.

**Keywords:** *Cojoba sophorocarpa*, *Enterolobium contortisiliquum*, linear regression.

## Introdução

A espécie *Cojoba sophorocarpa* (Benth), pertence à família Leguminosae, popularmente chamada de zarcilito, nativa do sul do México e América Central, proporciona grande quantidade de sombra, justamente pelo formato de sua copa, caracterizando, desse modo, uma boa opção para arborização de parques e jardins. É uma árvore tipicamente tropical, com tronco tortuoso de cor acinzentada, ramos longos e também tortuosos, copa baixa e densa, com flores esbranquiçadas que apresentam perfume suave. Seus frutos são vagens moniliformes ou cilíndricos, de cor vermelha, que contem poucas sementes de cor preta, além disso, é uma espécie que apresenta crescimento rápido e boa rusticidade, cuja disseminação ocorre exclusivamente via semente (LORENZI et al., 2003).

A semente é caracterizada como o meio de maior eficiência na transmissão de fitopatógenos e por consequência de doenças (JULLIATTI et al., 2011). Desse modo, voltar à atenção para a associação existente entre os fungos e as espécies florestais é importante, já que tal associação pode causar danos a qualidade e também a produção de mudas (SANTOS et al., 2001).

Quando se trata de espécies florestais, as sementes expostas a condições ambiente favoráveis, tornam-se vulneráveis ao ataque de fungos (CARNEIRO, 1986). E vários são os fungos que são responsáveis pela contaminação dessas sementes: *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (SANTOS et al., 2000).

Do ponto de vista agrônomo, o gênero *Aspergillus* é caracterizado como patógeno oportunista, sendo o *Aspergillus niger* o mais comum (VARGA et al., 2004), que é responsável por doenças em plantas (PERRONE et al., 2007). Em específico, as sementes de *Cojoba sophorocarpa* (Benth), por conta de sua longa exposição na árvore e no chão após caírem, também são susceptíveis a contaminação por fungos, dentre os quais se destaca o *Aspergillus niger*.

Diversos métodos alternativos, que visam o controle de fungos, vêm sendo testados (ROMEIRO, 1999), com o intuito de encontrar algum produto natural que seja capaz de proporcionar a planta uma maneira de se tornar resistente ao ataque de determinado fungo (MELO et al., 2009). Dentre os diversos produtos naturais com essa finalidade, se destaca o licor pirolenhoso (SILVEIRA, 2010), que é obtido através da condensação da fumaça que é liberada no processo de carbonização da madeira para a produção de carvão (ZANETTI et al., 2004).

Desse modo, o objetivo desse trabalho é analisar o uso do licor pirolenhoso como método alternativo visando a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* em sementes de *Cojoba sophorocarpa*.

## Metodologia

O experimento foi desenvolvido junto ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta. Foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (1: água destilada esterilizada + BDA (Batata dextrose Ágar); 2: licor pirolenhoso a 1% + BDA, 3: licor pirolenhoso a 10% + BDA; 4: licor pirolenhoso a 20% + BDA) e cinco repetições. Cada repetição foram consideradas três placas.

O fungo *Aspergillus niger* foi isolado de sementes de *Cojoba sophorocarpa* (Benth), coletadas das plantas utilizadas para arborização do município de Alta Floresta-MT. Após coleta, as sementes foram conduzidas ao laboratório para procedimento de identificação de patógenos. Para isso, foi realizada desinfestação superficial, onde as sementes foram desinfestadas em álcool 70% e depois em hipoclorito a 2% durante três minutos em cada, e logo após imersas em água destilada para remoção de resíduos. Após esse processo, cem sementes foram dispostas em quatro placas de Petri, com papel filtro umedecido com água destilada estéril a 2,5 vezes o peso do papel, com vinte e cinco sementes cada.

As placas foram vedadas e postas na câmara de germinação a 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias, após os quais foi identificado o patógeno, e a repicar em meio de cultura BDA com intuito de obter a cultura pura para utilizar no experimento. Os discos, para a aplicação dos tratamentos, foram obtidos por meio do fungo repicado em placas de petri com o meio de cultura BDA, colocados em incubadora B.O.D. a 25 °C durante quatro dias com fotoperíodo de 12 horas.

Após obter tais concentrações, foram acondicionadas 10ml de cada uma delas em três placas, constituindo uma repetição, e ao centro de cada uma dessas placas foram transferidos discos contendo micélio de *Aspergillus niger* obtidos de colônias puras. As placas foram vedadas com plástico filme, incubadas em câmara BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Foi avaliado o crescimento micelial das colônias através das medidas do crescimento radial das mesmas, em um eixo pré-estabelecido e demarcado em cada placa. As leituras foram realizadas com o auxílio de uma régua milimetrada, diariamente, até o momento em que a testemunha preencheu toda a superfície do meio de cultura.

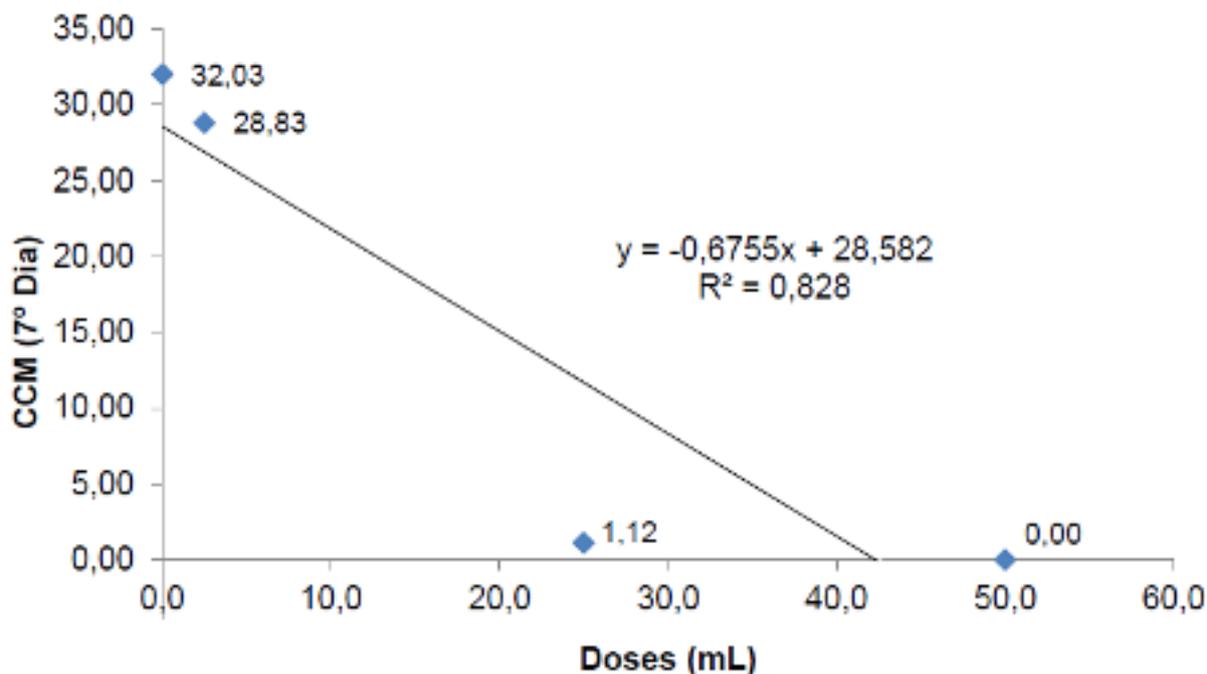
As variáveis analisadas foram o crescimento médio micelial, o índice de velocidade de crescimento (IVCM), e a porcentagem de inibição do crescimento (PIC). Para a análise estatística, foram utilizados os valores médios das variáveis supracitadas. Os

dados foram submetidos à análise de regressão linear, com intuito de determinar a concentração ótima no controle do fungo. A análise de regressão e a construção gráfica da mesma foram realizadas por meio do software livre R (2016).

## Resultados e discussão

Os menores valores de crescimento médio micelial (CMM) ocorreram para as concentrações a 10% e a 20% de licor pirolenhoso, os quais apresentaram valores de 1,12 e 0,0 CMM, respectivamente (Figura 1). Ainda observando a Figura 1, nota-se que a concentração a 1% do licor pirolenhoso apresenta valor muito próximo ao da testemunha, indicando que nessa concentração quase não há inibição do fungo *Aspergillus niger*.

Em estudos *in vitro*, Silva et al. (2013), verificaram que ao utilizar o licor pirolenhoso, em concentração de 10%, houve controle eficiente no desenvolvimento do fungo *Rhizodonia solani*, com restrição total do desenvolvimento do micélio. Já Santos Junior et al. (2013), mostraram que a inibição total do crescimento micelial ocorre em concentrações acima de 50% de licor pirolenhoso. Nesse trabalho, a concentração de 10% de licor pirolenhoso garantiu o controle total do fungo, pois perante a testemunha, o crescimento micelial nessa concentração foi insignificante.



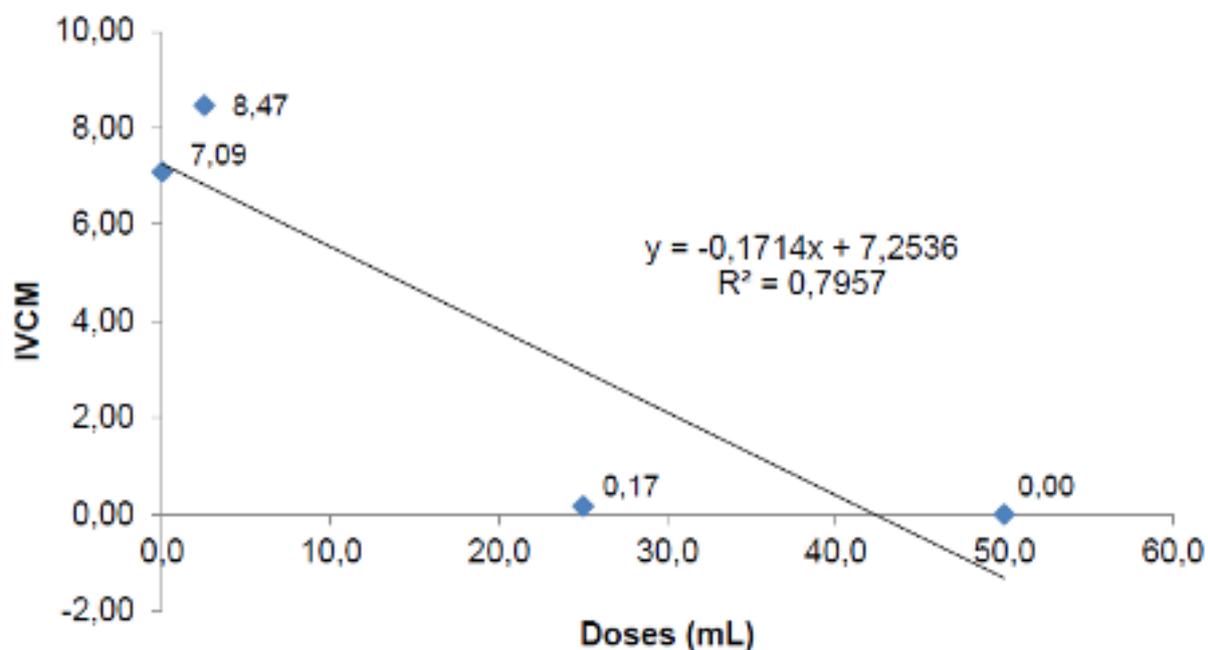
#### ◆ Crescimento Médio Micelial

Figura 1: Crescimento médio micelial de *Aspergillus niger* submetidos a diferentes concentrações de licor pirolenhoso de Timburi, após sete dias de incubação.

Para a maior concentração de licor pirolenhoso ocorre o menor IVCM (0,0), quando o mesmo é comparado a testemunha (7,09), caracterizando o licor pirolenhoso como um produto alternativo para a inibição do crescimento micelial do *Aspergillus niger* (Figura 2). Já ao comparar a concentração a 1% de licor com a testemunha observa-se que os valores de IVCM estão próximos, indicando que essa concentração não é indicada para o controle do fungo.

O fato das maiores concentrações de licor pirolenhoso apresentarem menores valores de IVCM corrobora com o que foi observado para os valores de CMM, que foram discutidos anteriormente.

Foi observado por Rodrigues (2014), que na concentração de 15% de licor pirolenhoso de Teca (*Tectona grandis*), a velocidade de crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi duas vezes menor que o valor observado para a testemunha. Também estudando o licor pirolenhoso de Teca, Donde et al. (2013), verificaram que na concentração de 20% do extrato ocorreu o menor valor de IVCM e na testemunha ocorreu o maior valor para essa variável.

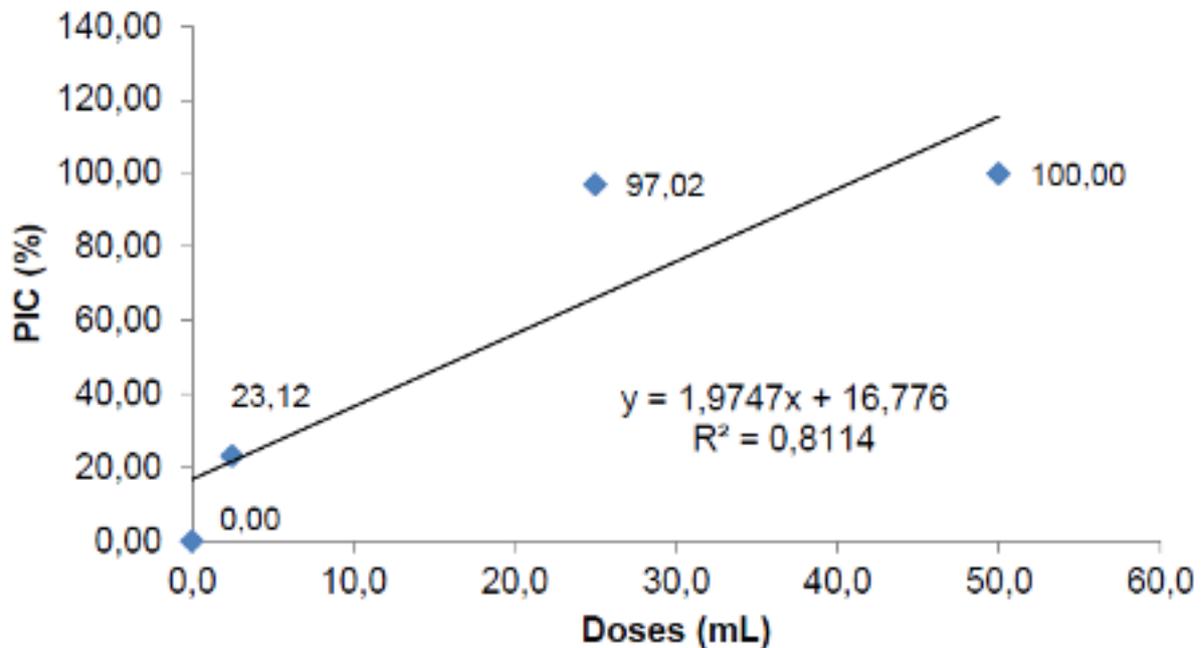


◆ Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

Figura 2: Índice de velocidade de crescimento micelial de *Aspergillus niger* submetidos a diferentes concentrações de licor pirolenhoso de Timburi, após sete dias de incubação.

Observa-se inibição de crescimento total de *Aspergillus niger* para a concentração de 20% de licor, e quase inibição total do crescimento (97,02%) para a concentração de 10% (Figura 3). Dessa maneira, é possível afirmar que houve ação fungicida do licor pirolenhoso sobre o crescimento do fungo *Aspergillus niger*.

Santos Junior et al. (2013), relataram resultados semelhantes, nos quais obtiveram na concentração de 10% de licor pirolenhoso inibição de crescimento de 100% do fungo. Donde et al. (2013), observaram inibição de 91% do fungo *Phytophthora* sp. na concentração de 20% de licor pirolenhoso de Teca.



#### ◆ Porcetangem de Inibição de Crescimento

Figura 3: Porcetangem de inibição de crescimento de *Aspergillus niger* submetidos a diferentes concentrações de licor pirolenhoso de Timburi, após sete dias de incubação.

## Conclusões

Existem efeitos promissores de inibição no desenvolvimento micelial *in vitro* do fungo *Aspergillus niger* nas concentrações de 10% e 20% de licor pirolenhoso de Timburi, apresentando, desse modo, potencial fungicida.

## Referências bibliográficas

CARNEIRO, J. S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11 p. 557-566, 1986.

DONDE, A.R.; RODRIGUES, C.; BAMBOLIM, A.; DAVID, G.Q.; PERES, W.M. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora sp.* In: **Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos**, n.1, 2013, Alta Floresta, Anais eletrônicos.... Alta Floresta, 2013.



JULIATTI, F.C. BIANCO JUNIOR, R.D.; MARTINS, J.A.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodoeiro produzidas nas regiões do Triângulo Mineiro e sul de Goiás. **Biociense Journal**, Uberlândia, v.27, n. 1, p. 24-31, 2011.

LORENZI, H; SOUZA, H. M; TORRES, M. A. V; BACHER, L. B. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, **SP: Instituto Platarum**, p.197, 2003.

MELO, R.M.C.A; MELO FILHO, P.A.; CÂMARA, M.P.S.; CÂMARA, C.A.G; SANTOS, R.C. Prospecção de óleos vegetais para controle da ramulose do algodoeiro. In: **Congresso Brasileiro do Algodão**, Foz do Iguaçu. Anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, p.1021-1027, 2009.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRlich, K. VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; MEYER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUE, W.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 53-66, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**, Disponível em <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

RODRIGUES, C. Uso de extrato pirolenhoso de teca (*tectona grandis*) no controle alternativo *in vitro* de *Colletotrichum glososporioides*. 2014. 57p. **Dissertação** (Mestrado em Biodiversidade e Agrossistemas Amazônicos), Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Universidade Estadual do Mato Grosso, Alta Floresta, 2014.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. **Viçosa: UFV**, 1999. 45p.

SANTOS, A.F.; JUNIOR, A.G.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, Curitiba, v.30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.

SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L. Fungos associados a sementes de espécies arbóreas da mata atlântica. **Colombo: EMBRAPA/CNPF**, 2001, p. 51-60 (Boletim de Pesquisa Florestal, 42).

SANTOS JUNIOR, A.C.; RODRIGUES, J.M.A.; OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, C.; DAVID, G.Q.; PERES, W.M. Fungitoxidade do extrato pirolenhoso ao fungo *Rhizoctonia solani*. In: **Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos**, n.1, 2013, Alta Floresta. Anais eletrônicos..., 2013.

SILVA, M. S.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M.; RODRIGUES, C. Controle alternativo "*in vitro*" de *Rhizoctonia solani* com extratos vegetais em Alta Floresta – MT. Vol. 8. In: **Congresso de Iniciação Científica**, Cáceres, Anais..., 2013.



SILVEIRA, C. M. Influência do extrato pirolenhoso no desenvolvimento e crescimento de plantas de milho. 2010. 75p. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VARGA, J.; JUHASZ, A.; KESEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. **Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species**. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JÚNIOR, D.; CARVALHO, S. A. Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em Limoeiro 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 529-533, 2004.