

Potencial de extrato de flores de *Crotalaria* no controle de nematoides da soja

CAMARGO, G.¹; MIYASAKI, A.K.²; COTRIM, G.²; SCUPINARI, T.³; HOFFMANN-CAMPO, C.B.⁴; DIAS, W.P.⁴; LOPES, I.O.N.⁴; NUNES, E.O.⁴

¹Universidade Pitágoras Unopar, Bolsista PIBIC/CNPq; ²Centro Universitário Filadélfia – Unifil;

³Universidade Estadual de Londrina; ⁴Embrapa Soja

Introdução

Em razão da importância da soja frente às necessidades alimentares mundiais, aumento da demanda por *commodities* agrícolas e ao limitado potencial de expansão das terras aráveis, o aumento da produção mundial tem se dado pela combinação da expansão de área de produção e do maior rendimento. No entanto, quando cultivares adaptadas são adotadas pelo produtor, a incapacidade de alcançar o rendimento ideal é associada às condições de estresse ambiental por fatores bióticos e/ou abióticos (BOARD; KAHLON, 2011).

Dentre os fatores bióticos, as patologias são responsáveis por grandes perdas na cultura da soja no Brasil e um importante grupo de patógenos que reduzem a produtividade são os fitonematoides (ALMEIDA et

al., 2005). Esses organismos exercem determinados graus de parasitismo que afetam o desenvolvimento do sistema radicular, com redução da absorção de água e nutrientes, e consequente ocorrência de subdesenvolvimento vegetal (CADET; SPAULL, 2005; TIHOHOD, 2000). Mais de 100 espécies de nematoides estão associadas à cultura da soja no mundo (DIAS et al., 2010), algumas delas têm causado perdas consideráveis na cultura da soja, com a necessidade de manejos diversificados. Segundo Ferraz (2001) e Juhász et al. (2013), no Brasil as espécies que causam maiores danos a essa cultura são *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*. Recentemente, o nematoide *Aphelenchoides* sp. foi relatado como agente causal da soja louca II (FAVORETO et al., 2015).

As plantas do gênero *Crotalaria* são empregadas na rotação de culturas por possuírem raízes profundas e robustas (auxiliam na descompactação pela formação de bioporos) que melhoram a infiltração de água no perfil do solo e por aumentarem a disponibilidade de N e P no sistema (CALEGARI; COSTA, 2009). O estudo de técnicas alternativas, como a adubação verde, para controlar fitonematoides é de extrema importância (MORAES et al., 2006). Plantas de *Crotalaria* no manejo, em sistemas conservacionistas, exercem efeitos antagônicos e/ou nematostáticos pela liberação de compostos secundários no ambiente (RITZINGER; FANCELLI, 2006). A supressão de nematoides foi evidenciada por Calegari et al. (1993), onde *C. spectabilis* e *C. ochroleuca* demonstraram serem efetivas no impedimento da multiplicação de populações juvenis, sugerindo que esse fenômeno está relacionado ao metabólito secundário monocrotalina (WANG et al., 2002). No entanto, existem evidências de que a toxidez também pode estar relacionada a outras classes de compostos bioativos ou da interação entre classes de metabólitos secundários (ALMEIDA et al., 2008; GARRIDO et al., 2008).

Portanto, o emprego da ecologia química no estudo de metabólitos secundários de plantas, a fim de dispor de diferentes recursos para o controle de fitonematoides (alternativos aos nematicidas sintéticos), pode contribuir para a manutenção da competitividade da cultura da soja. O

presente estudo objetivou avaliar o efeito nematicida e/ou nematostático de extrato de flores de *C. spectabilis* sobre formas juvenis (J2) de nematoides que afetam a cultura da soja.

Material e Métodos

Obtenção do extrato vegetal

Cultivo e preparo do material vegetal:

Crotalaria spectabilis foi escolhida por ser uma cultura supressora de nematoides muito utilizada no sistema de rotação de culturas da soja. A semeadura foi efetuada a lanço em 26/02/2016, em uma área de 325 m², latossolo vermelho-amarelo e textura arenosa (infestada de *M. incognita* e *P. brachyurus*) na área experimental Estância Água Rica (22°39'23" S e 50°20'51" W) em Assis, SP. A parte da planta de interesse foram as flores, colhidas 146 dias após a semeadura (início do período de florescimento). A colheita foi manual e no período matutino e, as flores acondicionadas em embalagens plásticas (não vedadas, para minimizar o efeito da evapotranspiração) e imediatamente transportadas ao laboratório para separação das flores do caule e do pecíolo. As amostras foram secas em estufa (40 °C), trituradas em triturador FAK-CLASSE I-IPX1 até obtenção de pó fino, pesadas em alíquotas de 50 g e armazenadas em freezer (-13 °C) até o momento da extração.

Extrato:

Foi utilizado o processo de turbo-extração a frio, seguido de maceração por oito dias (ao abrigo da luz) a temperatura ambiente; EtOH:H₂O (80:20 v/v) foi utilizado como solvente extrator. A proporção de biomassa seca de flores utilizada foi de 5% (m/v). O extrato foi filtrado em filtro Whatmann (Ø = 240 mm) e submetido a rotaevaporação (Rotavapor R124-BÜCHI®) em banho ultratermostático a 43 °C para evaporação da fração alcoólica do solvente e mantido sob refrigeração (4 °C), ao abrigo da luz até a realização dos bioensaios.

Obtenção dos organismos-teste:**Grupo de nematoides-teste:**

P. brachyurus, *M. javanica*, *H. glycines* e *Aphelechooides besseyi*. O método de Favoreto et al. (2011) foi usado para o *Aphelechooides*, sendo foi multiplicado em colônias de *Fusarium* sp. cultivado em meio PDA (ágar batata dextrose). Os demais fitonematoides foram multiplicadas em casa de vegetação nas cultivares suscetíveis. Os J2 de todos os nematoides foram extraídos no Laboratório de Nematologia da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Obtenção dos ovos dos nematoides:

Os ovos foram obtidos a partir de populações puras de cada espécie, multiplicadas, em casa de vegetação, isoladamente em plantas de soja suscetíveis. Os métodos foram: Bonetti e Ferraz (1981) para *Meloidogyne*; Coolen e D`Herdec (1972) para *Pratylenchus* e Dias et al. (1998) para *Heterodera*.

Obtenção dos juvenis (J2):

Os ovos de *P. brachyurus*, *M. javanica* e *H. glycines* obtidos no item 2.2 foram colocados em câmaras de eclosão individualizadas para cada grupo de nematoides, conforme metodologia de Rios (1990). Os J2 de *A. besseyi* foram obtidos de acordo com o método de Favoreto et al. (2011).

Ensaio de suscetibilidade dos grupos de nematoides ao extrato (in vitro):

O experimento consistiu em submeter uma suspensão dos J2, obtidos no item 2.3, ao extrato bruto de flores de *C. spectabilis* sob cinco diferentes concentrações: 0; 3,1; 6,2; 12,5; 18,8 e 25,0 (mg mL⁻¹) a um volume total de 4 mL (contendo \pm 100 J2 mL⁻¹). Para o controle e diluições utilizou-se H₂O destilada. Todos os ensaios foram efetuados em três repetições. A quantificação foi efetuada em câmara de Peter's, considerando a imobilidade dos J2. A avaliação foi efetuada em dois momentos:

Exposição:

Após 24 h de exposição ao extrato (24 h a.e.) sob incubação a 25 °C e ao abrigo da luz, cada repetição foi quantificada quanto a motilidade, então os nematoides foram lavados em H₂O destilada, filtrados em filtro de 0,45 μ e ressuspensos em H₂O destilada a um volume final de 4 mL. O resultado da exposição foi expresso em porcentagem de juvenis imóveis (efeito nematostático).

Recuperação:

Após 24 h de incubação em H₂O destilada (24 h a.e. + 24 h a.r.), nas mesmas condições descritas no item 3.1, foi efetuada nova quantificação em câmara de Peter's. Para confirmação da mortalidade foram adicionados 10 μ L de solução de corante do Nilo (8%) em cada uma das repetições, após 30 minutos foi realizada a quantificação dos indivíduos. Os indivíduos que não apresentaram motilidade e absorveram intensamente o corante foram considerados mortos. O resultado foi expresso em porcentagem de indivíduos mortos (efeito nematicida).

Análise estatística:

Os dados de imobilidade (24 h a.e) e mortalidade (24 h a.e. + 24 h a.r.) foram analisados por meio do modelo log-logístico de dose-resposta com quatro parâmetros, implementado no pacote R drc (RITZ et al., 2015).

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as curvas de resposta das populações de fito-nematoides submetidas ao ensaio de suscetibilidade para cinco diferentes concentrações de extrato etanólico bruto de flores de *C. spectabilis*. O tempo de ensaio foi de 48 h e avaliado em dois momentos: após 24 h (a.e) + 24 h (a.r.) e os resultados expressos em % de imobilidade de juvenis (J2).

O extrato etanólico de flores demonstrou efeito nematostático e nematicida para todos os quatro grupos de nematoides testados. A maior suscetibilidade foi observada para *H. glycines* com 59,6% (demonstrando suscetibilidade somente a partir de 18,7 mg mL⁻¹), seguido de *P.*

brachyurus com 51,2% na concentração máxima testada. Esse último nematoide apresentou uma tendência a resistência no ensaio de 24 h a.e., a partir da dose de 6,2 mg mL⁻¹. *M. javanica* e *A. basseyi* tiveram as mais altas taxas de recuperação, porém foram os que apresentaram 100% de imobilidade (efeito nematostático) na avaliação 24 h a. e.

A concentração letal média (CL₅₀) não pôde ser predita pelo modelo estatístico aqui adotado em função da baixa taxa de mortalidade nas concentrações do extrato aqui utilizadas. Grewal (1989) observou efeito nematicida de extratos (extração aquosa a quente) de flores de 3 espécies de plantas (*B. spectabilis*, *C. cinerarifolium* e *T. patula*) sobre *Aphelenchoides composticola*. Embora nenhum dos extratos tenha provocado 100% de mortalidade nas concentrações testadas (2-10%, correspondendo a 4-20 mg mL⁻¹), taxas superiores a 50% de morte foram observadas para a dose máxima aplicada (20 mg mL⁻¹), enquanto em nosso estudo foi de 34,0% para *A. besseyi*. É importante salientar que embora ambos os estudos tenham tido o mesmo tempo de recuperação, o tempo de exposição (48 h), foi o dobro do presente estudo (24 h), o nematoide foi do mesmo gênero, mas de espécie diferente e a natureza do solvente extrator também diferente (H₂O quente).

O corante Azul do Nilo mostrou-se um excelente corante vital aos quatro grupos de nematoides. Ao final de 24 h de incubação o efeito da exposição do nematoide ao extrato bruto foi considerado apenas como nematostático. O efeito nematicida foi considerado somente após a recuperação em água destilada (+ 2 4h de incubação) e aplicação do corante Azul do Nilo (Figura 2).

Devendra et al. (2012) detectaram a presença de duas classes de metabólitos secundários (alcaloides e terpenoides) em extratos etanólicos de folhas de *C. retusa*, *C. prostata* e *C. medicaginea*, alguns dos quais têm sido reportados como compostos com ação nematicida. Portanto, em nosso extrato tais compostos podem estar ausentes ou em concentrações abaixo da sua capacidade deletéria.

Em um estudo sobre o efeito nematicida de extrato etanólico de sementes de *C. spectabilis*, foi observada mortalidade de 53% do nematoide *P. brachyurus*, corroborando com o presente trabalho (efetuado nas mesmas condições) que apresentou uma taxa de mortalidade (52,1%) muito próxima na maior dose aplicada (SCUPINARI et al., 2016).

Conclusão

Quando se objetiva avaliar o efeito nematicida de extratos, a quantificação só deve ser considerada após o ensaio de recuperação uma vez que os percentuais de recuperação dos nematoides são muito elevados.

Extratos etanólicos de partes aéreas de *C. spectabilis* não apresentaram boa resposta na supressão das quatro populações de nematoides da soja aqui estudados, no entanto, outros solventes extratores deverão ser testados em trabalhos futuros.

O corante azul do Nilo apresentou-se como um excelente auxílio na diferenciação entre juvenis vivos e mortos, independente do gênero avaliado.

Referências

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. e CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 569-588.

ALMEIDA, C.D.S.; SOUZA, D.S.L.; SARTO, R.P.; FIRMINO, A.A.P.; SILVA, T.S.; MAGALHÃES, J.C.C.; SÁ, M.F.G.; ROCHA, T.L. **Fracionamento de extrato aquoso de sementes de *Crotalaria spectabilis* efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 10 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 78).

BOARD, J.E.; KAHN, C.S. Soybean yield formation: what controls it and how it can be improved. In: EL-SHEMY, H.A. (Ed.). **Soybean Physiology and Biochemistry**. Rijeka: InTech, 2011. p. 1-37.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

CADET, P.; SPAULL, V.W. Nematode parasites of sugarcane. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 645-674.

CALEGARI, A.; COSTA, A. Manutenção da cobertura melhora atributos do solo. **Revista Visão Agrícola**, v. 9, p. 13-16, 2009.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E.A.; WILDNER, L.P.; COSTA, M.B.B.; ALCÂNTARA, P.B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T.J.C. **Adubação verde no sul do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora AS-PTA, 1993. 364 p.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77p.

DEVENDRA, B.N.; SRINIVAS, N.; SOLMON, K.S. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 1, p. 37-41, 2012.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. **Nematoides em soja: identificação e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 7p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 76).

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; KIIHL, R.A.S. HIROMOTO, D.M.; ABDELNOOR, R.V. Quebra de resistência da cv. Hartwig por populações de campo de nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 971-974, 1998.

FAVORETO, L.; MEYER, M.C.; KLEPKER, D.; CAMPOS, L.J.M.; PAIVA, E.V. Ocorrência de *Aphelenchoides* sp. em plantas de soja com sintomas de Soja Louca II. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 32., 2015, Londrina. **Nematologia: problemas emergentes e perspectivas: anais**. Londrina: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2015. p. 81-82.

FAVORETO, L.; SANTOS, J.M., CALZAVARA, S.A.; LARA, L.A. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 35, p. 20-35, 2011.

FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginose da soja: passado, presente e futuro. Em: SILVA, J.F.V. (Ed.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginose da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 15-38.

GARRIDO, M.S.; SOARES, A.C.F.; COIMBRA, J.L.; SOUSA, C.S. Management of crotalaria and pigeon pea for control of yam nematode diseases. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 222-227, 2008.

GREWAL, P.S. Nematicidal effects of some plant-extracts to *Aphelenchoides composticola* (Nematoda) infesting mushroom, *Agaricus bisporus*. **Revue Nématologie**, v. 12, n. 3, p. 317-322, 1989.

JUHÁSZ, A.C.P.; PÁDUA, G.P.; WRUCK, D.S.M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N.R. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, v. 34, n. 276, p. 66-75, 2013.

MORAES, S.R.G.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A.; FONTANETTI, A.; CARVALHO, G.J. e MAXIMINIANO, C. Influência de leguminosas no controle de fitonematoides no cultivo orgânico de alface americana e de repolho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 188-191, 2006.

RITZ, C., BATY, F., STREIBIG, J.C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p.1-13, e0146021, 2015.

RITZINGER, C.H.S.P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 331-338, 2006.

SCUPINARI, T.; GRAÇA, J. P. da; LOPES, I. de O. N.; DIAS, W. P.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; NUNES, E. de O. *Crotalaria spectabilis* seeds extract and associated adjuvants: nematicide effect on the *Pratylenchus brachyurus* juveniles. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CHEMICAL ECOLOGY - ISCE, 32.; CONGRESSO OF THE LATIN AMERICAN ASSOCIATION OF CHEMICAL ECOLOGY ? ALAEQ, 4.; JOINT MEETING ISCE/ALAEQ, 1., 2016, Iguaçú. **Abstracts...** Londrina: [s. n.], 2016. p. 121.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 473 p.

WANG, K.H.; SIPES, B.S.; SCHIMITT, D.P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, v. 32, p. 35-57, 2002.

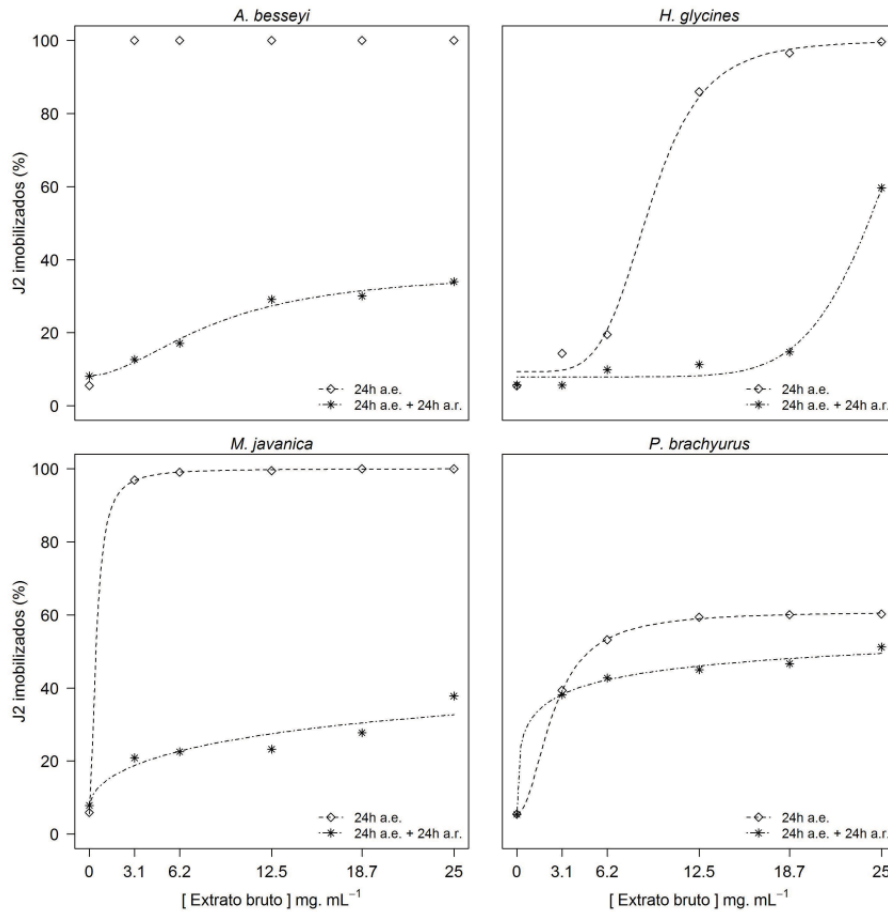


Figura 1. Curvas de resposta (% imobilização) de *A. besseyi*, *H. glycines*, *M. javanica* e *P. brachyurus* ao extrato etanólico de *C. spectabilis* [0, 3.1, 6.2, 12.5, 18.7 e 25 mg L⁻¹] após 24h exposição (extrato) e após recuperação (24h extrato + 24h H₂O destilada)

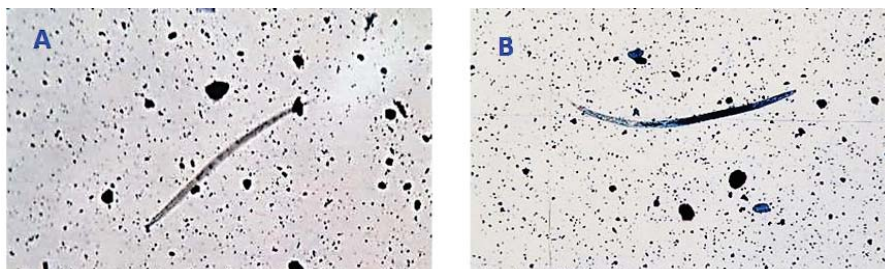


Figura 2. Juvenis (J2) de *M. javanica* sob microscópio óptico, aumentado de 10x; A0 J2 não corado (vivo) e B) J2 corado (morto), ambos após serem submetidos a coloração com Azul do Nilo (10mg mL^{-1})