

SÍNTESE DE FITOALEXINAS EM SOJA E SORGO POR EXTRATOS E TINTURAS PERTENCENTES A TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS

Julliano Matiello*

Livia Deice Raasch-Fernandes**

Gilcele de Campos Martin Berber***

Rogelho Alexandre Trento****

Solange Maria Bonaldo*****

RESUMO: A intensificação tecnológica na agricultura moderna e o uso indiscriminado de fungicidas para o controle de doenças de plantas causam danos ao ambiente e favorecem o surgimento de raças de patógenos resistentes a produtos químicos. Nesse sentido, buscam-se métodos de controle alternativo que sejam eficientes no controle populacional de patógenos em plantas, menos agressivos ao meio ambiente e ao homem. A ativação dos mecanismos de defesa, como a produção de fitoalexinas, pode ser uma alternativa viável na indução de resistência e no controle de doenças em algumas plantas cultivadas. Assim, o presente trabalho objetivou verificar a capacidade de indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo oriundos de extratos brutos aquosos e tinturas de plantas de espécies florestais. As espécies florestais utilizadas foram Angelim (*Hyemenolobium petraeum*), Cambará (*Qualea albiflora*) e Eucalipto (*Corymbia citriodora*). Os resultados obtidos mostraram que os extratos brutos aquosos são eficientes na indução de fitoalexinas do tipo gliceolina em cotilédones de soja, sendo que a espécie responsável por maior acúmulo desse composto foi o eucalipto. Em mesocótilos de sorgo, os extratos brutos aquosos de Angelim e Cambará induziram o acúmulo das fitoalexinas deoxiantocianidinas em baixas concentrações (1 e 5%). As tinturas induziram a produção de fitoalexinas nas concentrações de 10 e 15% em cotilédones de soja e não apresentaram produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

PALAVRAS-CHAVE: Extrato bruto aquoso; Indução de resistência; Tinturas.

* Engenheiro agrônomo graduado na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Sinop, Sinop (MT), Brasil.

** Mestranda em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCAM) na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Sinop (MT), Brasil.

*** Mestre em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCAM) na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Sinop (MT), Brasil.

**** Engenheiro agrônomo graduado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR) Brasil.

***** Docente Doutora da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) Campus Sinop; Docente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCAM), Campus Sinop (MT), Brasil.

E-mail: sbonaldo@ufmt.br

SYNTHESIS OF PHYTOALEXINS IN SOYBEAN AND SORGHUM FOR EXTRACTS AND TINCTURES BELONGING TO THREE FOREST SPECIES

ABSTRACT: Technological intensification in modern agriculture and the indiscriminate use of fungicides for weed control are damaging the environment and enhance the rise of pathogens resistant to chemical products. Alternative control that would be efficient in the population control of pathogens in plants, less aggressive to the environment and to human beings, is desirable. The activation of defense mechanisms, such as the production of phytoalexins, may be a feasible alternative in the resistance and disease control in cultivated plants. Current paper verifies the capacity of phytoalexin induction in soybean cotyledons and in sorghum mesocotyls derived from the aqueous crude extracts and tinctures of forest plant species such as *Hyemenolobium petraeum* (angelim), *Qualea albiflora* (cambará) and *Corymbia citriodora* (eucalyptus). Results showed that aqueous crude extracts are efficient in the induction of glyceoline-type phytoalexins in soybean cotyledons, with eucalyptus as the species with the highest accumulation of the compound. The aqueous crude extracts from angelim and cambará in sorghum mesocotyls induced the accumulation of deoxyanthocyanidin phytoalexins at low concentrations (1 and 5%). Tinctures induced the production of phytoalexins at concentration 10 and 15% in soybean cotyledons without the production of phytoalexins in sorghum mesocotyls.

KEY WORDS: Aqueous crude extract; Resistance induction; Tinctures.

INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem sido uma ferramenta importante na manutenção da produção agrícola, bem como no controle de doenças em plantas (VENTUROSO et al., 2010). Atualmente as práticas agrícolas no Brasil podem ser caracterizadas pela elevada dependência de agrotóxicos, tendo se difundido amplamente, nos últimos três anos, como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo responsável por 1/5 do consumo mundial (ALENCAR et al., 2014).

Entretanto, essa estratégia resulta em impactos ecológicos negativos decorrentes do efeito residual destes produtos nas áreas cultivadas e da contaminação dos recursos hídricos, comprometendo o sistema de produção sustentável (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000). Neste sentido, os fitopatógenos comumente

apresentam resistência aos produtos que visam o seu controle, o que indica que a busca de novas estratégias de controle dos fitopatógenos deve ser estudada.

Além disto, para a viabilidade da agricultura orgânica, em que o sistema agrícola mantém produção evitando ou excluindo fertilizantes sintéticos e pesticidas como proposto por Altieri (1989), se faz necessária a busca por novos métodos de controle de doenças em plantas. Neste sentido, o uso de extratos vegetais para o controle de fitopatógenos, seja por efeito direto sobre o fitopatógeno ou pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas, tem sido descrito por diversos autores, como Carlos et al. (2010); Colpas et al. (2009) e Moreira et al. (2008).

Piati et al. (2011) relataram que a espécie *Eucalyptus globulus* reduz o crescimento micelial, a produção e germinação de esporos de *Penicillium* sp.; e Dias-Arieira et al. (2010) relataram a redução do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* com extratos de *E. citriodora* e *Azadirachta indica*.

Silva et al. (2012) observou que o uso de extrato aquoso de cravo-da-índia controlou 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Pyricularia oryzae*. No mesmo estudo, o extrato aquoso de alho promoveu alta inibição no desenvolvimento micelial e o extrato de pimenta resultou em toxicidade sobre os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Pyricularia oryzae*.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular e produzidas pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995). A ativação de mecanismos de defesa, como o acúmulo de fitoalexinas em soja e sorgo, indicando a presença de compostos com características elicitoras nos extratos vegetais, foram observadas por Bonaldo et al. (2004); Franzener et al. (2007); Meinerz et al. (2008); e Rodrigues et al. (2007).

A produção de fitoalexinas é considerada um dos principais mecanismos de defesa das plantas, estando diretamente associada à prevenção da infecção por muitos patógenos, como pisatina em ervilha, gliceolina em soja, faseolina em feijão e gossipol em algodão (LYDON; DUKE, 1989; TAIZ; ZEIGER, 1998). O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade elicitora ou antimicrobiana pode ser uma alternativa de controle de doenças em plantas (STANGARLIN et al., 2000).

Em soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanoide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja e mesocótilos estiolados de sorgo mostrou-se como excelente ferramenta para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

Em sorgo são produzidos compostos fenólicos em resposta à inoculação ou não com fungos patogênicos, sendo que entre estes, foram identificadas quatro fitoalexinas derivadas de antocianidinas (flavonoides-3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, 5-metoxiluteolinidina, apigeninidina e éster do ácido caféico de arabinisol 5-o-apigeninidina (NICHOLSON et al., 1988). Bioensaios utilizando mesocótilos estiolados de sorgo e cotilédones de soja são ferramentas importantes para se testar o efeito elicitor de um tratamento (STANGARLIN et al., 2000).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo a partir de extratos brutos aquosos (EBAs) e tinturas obtidas das espécies florestais angelim (*Hyemenolobium petraeum*), cambará (*Qualea albiflora*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia/Fitopatologia da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop (MT). Foram utilizadas as espécies florestais angelim (*H. petraeum*), cambará (*Q. albiflora*) e eucalipto (*C. citriodora*). Nos bioensaios com cotilédones de soja (*Glycine max*), foi utilizada a cultivar MONSOY 8866 para os ensaios com extratos bruto aquosos e a cultivar V-MAX para os ensaios com tintura. Para os bioensaios com mesocótilos de sorgo (*Sorghum bicolor*), foi utilizado somente uma cultivar, BRS-310, tanto para os ensaios de extrato bruto aquoso quanto para tintura.

Para a obtenção do extrato bruto aquoso foram realizados oito tratamentos e para tinturas seis, incluindo a testemunha, com cinco repetições para cada tratamento. Nos dois bioensaios, para o tratamento testemunha, foi utilizada somente água destilada.

2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento foi inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância e testes de comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), empregando o programa de análise estatística ESTAT, versão 2.0 (BARBOSA; MALHEIROS; BANZATTO, 1992). Foram analisadas a interação entre as concentrações dos EBAs e das tinturas das espécies utilizadas, como também a interação entre concentrações e as espécies.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA)

Os extratos brutos aquosos com 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50% de material vegetal foram obtidos pela coleta de folhas em meio ambiente. As folhas foram lavadas previamente e trituradas em liquidificador com água destilada esterilizada, e o extrato bruto obtido foi filtrado em gaze e em papel de filtro Whatman n. 41, conforme descrito por Bonaldo et al. (2004).

2.3 OBTENÇÃO DAS TINTURAS

Folhas frescas das espécies florestais foram coletadas e trituradas em liquidificador com álcool comercial hidratado na proporção de 250 g de material vegetal por 1000 mL de álcool. As folhas permaneceram em maceração por 15 dias e os frascos foram agitados diariamente durante este período (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). O extrato resultante foi filtrado e o volume inicial repostado com o álcool, sendo armazenado em frasco âmbar, em temperatura ambiente. As tinturas foram diluídas nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 15% para serem utilizadas nos bioensaios de produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja.

2.4 BIOENSAIO PARA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA

As sementes de soja foram plantadas em areia esterilizada e mantidas em condições ambientais, com temperatura em torno de 25 °C e umidade relativa do ar acima de 50%. Após nove dias, os cotilédones foram destacados das plântulas,

lavados em água destilada, enxugados e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Cada placa foi considerada uma unidade experimental, com 5 repetições por tratamento. Foi aplicada sobre cada cotilédone uma alíquota de 75 mL do extrato bruto aquoso ou da tintura. As placas de Petri foram mantidas a 25 °C no escuro por 20 horas e, em seguida, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada e deixados em agitação por 1 hora para extração da fitoalexina. A fitoalexina induzida em cotilédones de soja é a gliceolina e a absorbância foi determinada a 285 nm (ZIEGLER; PONTZEN, 1982).

2.5 BIOENSAIO PARA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO

O bioensaio de fitoalexinas em sorgo foi realizado conforme descrito por Wulff (1997). Sementes de sorgo foram desinfetadas em hipoclorito de sódio 1% (15 minutos), lavadas em água destilada e embebidas em água sob temperatura ambiente por 6 horas. Após este período foram enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas em escuro a 28 °C por 4 dias. As plântulas formadas foram expostas a luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos.

No teste de produção de fitoalexinas, os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de ensaio (1,2 x 10 cm; sendo 3 mesocótilos por tubo/repetição e 5 repetições por tratamento), contendo o extrato bruto aquoso ou as tinturas. Estes tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25 °C sob luz fluorescente por um período de 60 horas (WULFF, 1997). Após esse período, os mesocótilos foram retirados dos tubos, secos e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5 cm) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocadas em tubos para microcentrífuga contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v v⁻¹). Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4 °C no metanol por 96 horas para extração dos pigmentos. A fitoalexina induzida nos mesocótilos de sorgo foi a deoxiantocianidina e a absorbância foi determinada a 480 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA POR EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA)

Os resultados indicaram que o EBA de eucalipto apresentou maior síntese de fitoalexinas nos cotilédones de soja (Tabela 1), em que a concentração de 50% obteve melhor resultado, apresentando diferença estatística das demais, com valor médio de indução de 9,11 $ABS_{285} \text{ g.p.f.}^{-1}$, seguidas das concentrações de 25 e 20%, com indução de 4,78 e 4,29 $ABS_{285} \text{ g.p.f.}^{-1}$, respectivamente, que não diferiram entre si.

Em relação às outras espécies, o EBA de cambará induziu maior produção de fitoalexinas do que o EBA de angelim, sendo que as concentrações que diferiram estatisticamente na espécie cambará foram de 50 e 25%, com valor médio de indução de 2,88 e 1,77 $ABS_{285} \text{ g.p.f.}^{-1}$. As maiores induções foram obtidas a partir da concentração de 15% de extrato bruto aquoso. As concentrações de 5%, 1% e zero (testemunha) apresentaram os menores valores de produção de fitoalexinas em cotilédones de soja, porém, não diferiram da concentração de 10% (Tabela 1).

Tabela 1. Médias da indução de gliceolina em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de espécies florestais

Concentração extrato bruto aquoso (%)	Espécies florestais		
	Angelim	Cambará	Eucalipto
0	0,28 ¹ ±0,13 B a	0,37±0,07 D a	0,29±0,05 E a
1	0,29±0,14 B a	0,39±0,10 D a	0,38±0,08 E a
5	0,36±0,15 B a	0,42±0,06 CD a	0,56±0,10 DEa
10	0,26±0,06 B b	1,12±0,06 BCD ab	1,46±0,07 D a
15	0,34±0,08 B b	1,12±0,10 BCD b	2,83±0,38 C a
20	0,69±0,16 AB b	1,46±0,10 BC b	4,29±0,45 B a
25	0,96±0,32 AB b	1,77±0,14 B b	4,78±1,60 B a
50	1,58±0,21 A c	2,88±0,34 A b	9,11±1,47 A a

CV (%) = 34,57

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

¹Valor de absorvância (285 nanômetros para gliceolina).

²Desvio padrão (±).

Segundo Bonaldo et al. (2004), o extrato aquoso de *C. citriodora*, não autoclavado, induziu a síntese de fitoalexinas em soja a partir das concentrações de 1% e 15%. Porém, neste estudo, observou-se maior produção de fitoalexinas em cotilédones a partir de concentrações acima de 15% do extrato bruto aquoso de eucalipto. Essa diferença na capacidade de indução por extrato bruto aquoso de uma mesma espécie pode ser explicada pela interferência do ambiente, que pode alterar o metabolismo secundário, modificando a composição de um extrato bruto aquoso e, assim, causando disparidades entre diferentes ensaios de indução a fitoalexinas.

Além da interferência do ambiente, que pode influenciar nos compostos químicos presentes em metabólitos secundários de plantas bioativas, outros fatores devem ser considerados, como a variabilidade genética e a idade da folha, com o aumento ou redução da quantidade desses componentes. Em relação à variabilidade genética, pode haver comportamentos distintos na produção de biomassa foliar, rendimento em óleo e teor de citronelal (VITTI, 1999). Franich (1986) relata que, para o *Eucalyptus nitens*, o rendimento do óleo essencial para folhas juvenis foi de 1%, ou seja, menos da metade do que o normalmente relatado para folhas de árvores adultas (2,5%).

Resultados semelhantes demonstrando que as substâncias elicitoras de indução estão relacionadas com a maior concentração dos preparados foram obtidos por Mazaro et al. (2008), ao avaliarem o uso de derivados de folhas de pitangueira na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja.

Os resultados obtidos elucidam que, possivelmente, concentrações elevadas dessas substâncias fazem com que a percepção de sinais derivados do elicitor seja mais eficiente, causando alterações no metabolismo celular, como ativação de proteínas G, aumento no fluxo de íons por meio da membrana plasmática, atividade de quinases e fosfatases e produção de mensageiros secundários (CAVALCANTI et al., 2005), ativando rotas metabólicas como a síntese de fitoalexinas.

3.2 SÍNTESE DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO POR EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA)

De acordo com os resultados obtidos, a espécie florestal camará induziu maior produção de fitoalexinas quando comparado aos EBAs de angelim em me-

socótilos de sorgo. Em relação ao EBA de eucalipto, este não induziu a síntese de fitoalexinas em sorgo. O EBA de cambará apresentou diferença de indução nas concentrações de 1% (Tabela 2), com valor médio de indução de 23,21 $\text{ABS}_{480} \text{ g.p.f.}^{-1}$, porém, em outras concentrações não foram observadas diferenças na indução das fitoalexinas.

Tabela 2. Médias da indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de espécies florestais

Concentração de extrato bruto aquoso (%)	Espécies florestais		
	Angelim	Cambará	Eucalipto
0	13,54 ¹ ± 1,34 B a	11,32 ± 2,79 B a	11,02 ± 3,78 A a
1	15,57 ± 4,94 B b	23,21 ± 5,32 A a	0,37 ± 0,60 C c
5	23,37 ± 8,41 A a	16,94 ± 5,83 AB b	0,79 ± 0,33 C c
10	15,02 ± 1,70 B a	17,36 ± 4,62 AB a	2,10 ± 1,34 BC b
15	9,31 ± 2,33 BC a	11,43 ± 2,22 B a	2,64 ± 1,23 BC b
20	8,17 ± 3,79 BC ab	10,52 ± 3,48 B a	2,47 ± 1,10 BC b
25	5,57 ± 1,19 C b	12,96 ± 1,56 B a	9,27 ± 3,65 B ab
50	2,44 ± 1,03 C b	11,44 ± 3,10 B a	5,19 ± 1,31 BC b

CV (%) = 37,69

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

¹Valor de absorbância (480 nanômetros para deoxiantocianidinas) por grama de peso fresco.

²Desvio padrão (\pm).

Para o EBA de angelim, observou-se maior produção de fitoalexinas na concentração de 5%, 23,37 $\text{ABS}_{480} \text{ g.p.f.}^{-1}$ de valor médio (Tabela 2). As concentrações de 15% e 20% inibiram a produção de fitoalexinas. Foi verificado baixo valor de produção de fitoalexinas para as concentrações de 25% e 50%.

Os resultados demonstraram que os EBAs de cambará e angelim apresentaram potencial de indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo nas concentrações de 1%, 5% e 10%, enquanto que este potencial é reduzido nas concentrações de 15%, 20%, 25% e 50%.

Diferentes resultados foram obtidos por Bonaldo et al. (2004), que testa-

ram diferentes concentrações (0,1; 1; 5; 10; 15; 20; e 25%) de extrato de eucalipto, demonstrando que a produção de fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo foi mais expressiva nas concentrações acima de 10%, e gliceolina em cotilédones de soja acima de 15%.

A inibição pelo EBA de eucalipto pode ter ocorrido devido a diversos fatores, que têm influência no rendimento e composição química das folhas no momento de coleta, interferindo no metabolismo secundário, reduzindo o potencial de indução de fitoalexinas. Dentre estes, pode-se citar como relevantes a genética, as condições ambientais (luz, água, temperatura, solo, tipo de manejo florestal, etc) e os fisiológicos (parte utilizada da planta, a idade da planta e da folha, etc.) (XAVIER, 1993).

3.3 SÍNTESE DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA POR TINTURAS

As tinturas de espécies florestais nas concentrações de 0,5%, 1% e 5% não diferiram do controle negativo, enquanto que as concentrações de 10% e 15% apresentaram induções significativas em relação às menores concentrações (Tabela 3).

Tabela 3. Médias da indução de gliceolina em diferentes concentrações de tinturas de espécies florestais

Concentração de tinturas (%)	Espécies florestais		
	Angelim	Cambará	Eucalipto
0	0,22 ¹ ±0,02 C a	0,21±0,03 C a	0,33± 0,05 C a
0,5	0,21±0,06 C a	0,20±0,01 C a	0,36±0,05 C a
1	0,18±0,03 C a	0,19±0,05 C a	0,19±0,03 C a
5	0,30±0,05 C a	0,16±0,03 C a	0,29±0,04 C a
10	1,79±0,16 B a	1,28±0,10 B b	1,87±0,08 B a
15	2,24±0,23 A a	1,96±0,14 A b	2,35±0,19 A a

CV (%) = 13,56

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

¹Valor de absorvância (285 nanômetros para gliceolina).

²Desvio padrão (±).

Dentre as tinturas de espécies florestais, eucalipto e angelim foram mais eficientes na produção de gliceolina, tendo melhores resultados nas concentrações de 10 e 15%, porém, não diferiram estatisticamente entre si. Para a espécie angelim, houve indução de 1,79 e 2,24 ABS_{285} g.p.f.⁻¹ nas concentrações de 10 e 15%, respectivamente. O eucalipto obteve nas concentrações de 10 e 15%, 1,87 e 2,35 ABS_{285} g.p.f.⁻¹, respectivamente, de valor médio de indução. A tintura de cambará apresentou menor produção de fitoalexinas em relação às espécies testadas.

A indução do eucalipto pode ser atribuída ao óleo essencial, que em sua composição química podem ocorrer diversas substâncias orgânicas com capacidade de indução de resistência, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre (DEWICK, 1997).

Os resultados demonstrados, com diferença significativa entre as espécies e concentrações, podem ser atribuídos ao processo de interação dos elicitores com a planta, onde ocorre o estabelecimento de uma série de resposta envolvendo liberação de sinais moleculares, iniciando pelo reconhecimento ou pela percepção, pela transdução do sinal e pela tradução para a ativação de genes de defesa (BOSTOCK, 2005), podendo variar conforme espécies e metabolismo secundário de cada planta.

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, são semelhantes aos encontrados por Gouvea et al. (2011) que, ao estudarem extratos vegetais de neem (*Azadirachta indica*) na indução de fitoalexinas de soja, verificaram que induziram a produção de fitoalexinas gliceolinas em soja. Guimarães (2012) obteve induções de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, utilizando preparados de cavaliinha, em diferentes concentrações, com destaque para os preparados obtidos através de extração alcoólica, que apresentou superioridade em todas as concentrações, exceto nas de 1% e 40%.

3.3 SÍNTESE DE FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO POR TINTURAS

A síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo está expressa na Tabela 4. As tinturas de todas as plantas testadas não foram eficientes na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Tabela 4. Médias da indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em diferentes concentrações de tinturas de espécies florestais

Concentração de tinturas (%)	Espécies florestais		
	Angelim	Cambará	Eucalipto
0	7,21 ¹ ± 0,86 A a	7,61 ± 2,67 A a	2,46 ± 1,27 A b
0,5	0,00 ± 0,00 B b	0,00 ± 0,00 B b	2,41 ± 1,33 A a
1	0,00 ± 0,00 B a	0,00 ± 0,00 B a	0,17 ± 0,08 B a
5	0,00 ± 0,00 B a	0,31 ± 0,06 B a	0,17 ± 0,12 B a
10	0,00 ± 0,00 B a	0,39 ± 0,04 B a	0,19 ± 0,07 B a
15	0,00 ± 0,00 B b	0,41 ± 0,01 B ab	0,53 ± 0,12 B a

CV (%) = 18,05

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

¹Valor de absorvância (480 nanômetros para deoxiantocianidina) por grama de peso fresco.

²Desvio padrão (±).

Dados foram transformados: raiz (x + alfa), sendo alfa = 0,5.

A análise com as tinturas de espécies florestais mostrou que houve diferença entre as concentrações e as espécies utilizadas. A tintura de angelim não foi capaz de induzir a síntese em mesocótilos de sorgo, de forma que em todas as concentrações obtiveram zero para o valor de ABS₄₈₀. Para a tintura de cambará apenas as concentrações de 0,5% e 1% obtiveram zero, e as concentrações de 5%, 10% e 15% apresentaram um valor médio de 0,31, 0,39, 0,41 ABS₄₈₀ g.p.f.⁻¹, respectivamente, diferindo do tratamento negativo.

Em todas as concentrações da tintura de eucalipto, inclusive no tratamento testemunha, houve produção de fitoalexina. A indução no tratamento testemunha, possivelmente, seja devido à produção destas, induzidas pela lesão mecânica realizada nos cotilédones, sendo que as fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (CAVALCANTI et al., 2005). Assim, observou-se que a concentração de 0,5% obteve um valor de indução médio de 2,41 ABS₄₈₀ g.p.f.⁻¹, como também o controle negativo de 2,46 ABS₄₈₀ g.p.f.⁻¹, não diferindo os tratamentos estatisticamente.

As concentrações de 1%, 5%, 10% e 15% apresentaram valores de 0,17, 0,17, 0,19 e 0,53 $ABS_{480} \text{ g.p.f.}^{-1}$, respectivamente, e não diferiram entre si, mas diferenciaram-se do controle negativo e da concentração de 0,5%.

Com base nesses resultados, a tintura de eucalipto inibiu a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, tendo como exceção a concentração de 0,5%. Nos mesocótilos tratados com as tinturas de camará e eucalipto houve pequena produção da fitoalexina, sendo os valores considerados baixos, pois estes foram inferiores aos observados no tratamento zero (testemunha). A tintura de angelim não induziu a síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, em todas as concentrações analisadas, o que pode indicar que esta tintura possa induzir suscetibilidade nas plantas, o que deverá ser melhor avaliado em estudos futuros.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos brutos aquosos de espécies florestais foram efetivos como indutores de fitoalexinas em cotilédones de soja e, quanto maior a concentração do extrato, maior a produção de glicolina.

Os extratos brutos aquosos das espécies florestais angelim e camará foram capazes de induzir a síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em baixas concentrações.

As tinturas de todas as espécies utilizadas apresentaram potencial para indução de fitoalexinas em cotilédones de soja nas concentrações de 10 e 15%, enquanto que nas concentrações mais baixas houve inibição da síntese de fitoalexinas.

As tinturas utilizadas inibiram a síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e não apresentaram potencial como indutores.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo auxílio financeiro - Processo nº 578323/2008, e ao CNPq/PIBIC pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor para execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, L. D.; PEREIRA NETO, J. R.; DE ALENCAR, L. D.; BARBOSA, E. M.; SOUZA, A. S. Uso indiscriminado de agrotóxicos no projeto de irrigação das várzeas de Sousa-PB. **Revista Verde**, v. 9, n. 4, p. 117-122, 2014.

ALTIERI, M. **Agroecologia**: as bases científicas da agricultura alternativa. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989.

BARBOSA, J. C.; MALHEIROS, E. B.; BANZATTO, D. A. **ESTAT**: um sistema de análises estatísticas de ensaios agronômicos. Versão 2.0. Jaboticabal: Unesp, 1992.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 128-134, 2004.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

CARLOS, M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ITAKO, A. T.; BONALDO, S. M.; MESQUINI, R. M.; CARVALHO, J. B.; STANGARLIN, J. R. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassicola* e proteção de pepino a mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 309-316, 2010.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

COLPAS, F. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FERRARESE, M. L.; SCAPIM, C. A.; BONALDO, S. M. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 191-195, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 520 p.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; MIGUEL, E. G.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 228-232, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 392p.

FRANICH, R. A. Essential oil composition of juvenile leaves from coppiced *Eucalyptus nitens*. **Phytochemistry**, n. 25, p. 245-246, 1986.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A. S. M.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWANN-NESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, p. 29-38, 2007.

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e Campo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 70-78, 2011.

GUIMARÃES, S. S. **Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro***. 2012. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. **Pesticide Science**, London, v. 25, n. 4, p. 361-373, 1989.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de Soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1824-1829, 2008.

MEINERZ, C. C.; FORMIGHIERI, A. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; DIETERICH, C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e

soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 2, p. 26-31, 2008.

MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 332-337, 2008.

NICHOLSON, R. L.; JAMIL, F. F.; SNYDER, B. A.; LUE, W. L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, p. 271-278, 1988.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 2, p. 1033-1040, 2011.

PURKAYASTHA, R. P. Progress in phytoalexin research during the past years. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.). **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, p. 1-39, 1995.

RODRIGUES, E.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; FIORI, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 124-128, 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1-2, p. 129-137, 2000.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J. O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável grupo verde de agricultura alternativa**, v. 7, p. 80-86, 2012.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 16-21, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant defenses: surface protectants and secondary metabolites. *Plant physiology Sunderland*. **Sinauer Associates**, cap.13, p. 347-376, 1998.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 12, n. 4, p. 499-505, 2010.

VITTI, A. M. S. **Avaliação do crescimento e do rendimento e qualidade do óleo essencial de procedências de *Eucalyptus citriodora***. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

WULFF, N. A. **Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidos a partir de *Saccharomyces cerevistae***. 1997. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

XAVIER, A. **Variabilidade genética de óleo essencial e de crescimento em progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus citriodora* Hook**. 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, 20, p. 321-331, 1982.

Recebido em: 03 de julho de 2014
Aceito em: 22 de dezembro de 2015