

Atividade antifúngica de substâncias voláteis presentes em *Brassica napus* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*

Anti-fungal activity of *Brassica napus* volatile compounds against *Fusarium oxysporum*

Márcia de Fátima Inácio Freire¹, Matthew J. Morra² & Guy R. Knudsen³

RESUMO – No presente trabalho avaliou-se a ação da liberação de isotiocianatos do farelo de *Brassica juncea* e duas variedades de *Brassica napus* (Dwarf Essex e Athena) contra 4 diferentes isolados de *Fusarium oxysporum*: 9321A, 9312F, 9051C e 9243G, patógenos de solo isolado a partir de sementeiras de *Pseudotsuga menziesii* (Douglas-fir) e *Pinus strobus* (pinus branco) localizadas em Idaho-USA.

PALAVRAS-CHAVE – Isotiocianatos, glucosinolatos, atividade antifúngica, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Fusarium oxysporum*.

SUMMARY – The present paper was carried out in order to evaluate the isothiocyanate liberation from powdered *Brassica juncea* and two varieties of *Brassica napus* (Dwarf Essex and Athena) against 4 different strains of *Fusarium oxysporum*: 9321A, 9312F, 9051C and 9243G, isolated from seeded *Pseudotsuga menziesii* (Douglas-fir) and *Pinus strobus* (white pine) cultivated in Idaho-USA.

KEYWORDS – Isothiocyanates, glucosinolates, antifungal activity, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Fusarium oxysporum*.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos o que parecia ser a solução definitiva para o cultivo vegetal se transformou em uma arma contra a própria natureza. Agentes microbianos e insetos entraram em desequilíbrio ou desenvolveram mecanismos de resistência transformando-se em fatores limitantes, exigindo doses maiores mais intensas de agroquímicos para se manterem. Produtos que ofereciam algum alívio imediato e conseqüências imprevisíveis para o futuro foram massivamente utilizados. A alta toxidez e os efeitos residuais nocivos foram percebidos depois de décadas de utilização, que aliado à alta plasticidade biológica de alguns microorganismos têm estimulado a pesquisa por novos produtos que não sejam agressivos ao meio ambiente (Bermagini Filho & Kimati 1995; Campanhola & Bettioli, 2003). Plantas da família Brassicaceae, tais como mostarda, canola, brócolis e outras produzem substâncias chamadas glucosinolatos, que através de ação enzimática transformam-se em isotiocianatos (ITC), substâncias muito eficientes como biocidas naturais. Pesquisadores de diferentes partes do mundo têm investigado, com sucesso, as propriedades biológicas do resíduo da extração do óleo das sementes e a utilização do material verde de brassicas, incorporado-os ao cultivo de plantas atacadas por fitopatógenos sensíveis (Brown and Morra, 1997, Borek, et al, 1995, Borek, et al 1997). A degradação dos tecidos de brassica no solo libera estes compostos que podem reduzir a incidência de patógenos além de melhorar as condições físicas e químicas pela incorporação de matéria orgânica (Kirkegaard et al, 1994; Brown, et al, 1994). O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica de compostos voláteis liberados pelos resíduos de *Brassica juncea* e duas variedades de *Brassica napus* (Dwarf Essex e

Athena) contra 4 diferentes isolados de *Fusarium oxysporum*: 9321A, 9312F, 9051C e 9243G, patógenos de solo isolados a partir de sementeiras de *Pseudotsuga menziesii* (Douglas-fir) e *Pinus strobus* (pinus branco).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do material

Os isolados de números de 9051C, 9312F, 9321A e 9243G de *Fusarium oxysporum* foram obtidos anteriormente a partir de três viveiros localizados no estado de Idaho-USA e estavam estocados no Laboratório de Microbiologia na Universidade de Idaho. As culturas foram reativadas e mantidas em meio de cultura Batata Dextrose Agar, comercialmente obtido (Smolinska et al, 2003) até o momento de uso.

O farelo de *Brassica juncea* e das duas variedades de *Brassica napus* (Dwarf Essex e Athena) já se encontravam estocados no Laboratório de Bioquímica do Solo e haviam sido anteriormente fornecidas pelo Food Science and Toxicology – College of Agriculture, University of Idaho. *B. napus* e *B. juncea* são espécies habitualmente cultivadas para fins alimentícios no estado de Idaho.

As culturas fúngicas, depois de reativadas, foram crescidas por 5 dias em Placas de Petri contendo BDA. Após este período, dois discos de 5mm de diâmetro foram retirados de cada dos 4 isolados de *F. oxysporum* e colocados de forma equidistante dentro de outra placa previamente preenchida com Batata Dextrose Agar (BDA), onde foi depositado um pequeno recipiente de alumínio de dois centímetros de diâmetro contendo um grama de farelo de cada uma das amostras a serem testadas, seguindo metodologia descrita por Dandurand et al (2000), com modificações. A seguir, adicionou-se

Recebido em 10/10/2003

¹Laboratório de Fitossanidade; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ; ²Soil Biochemistry Laboratory, College of Agronomy, University of Idaho, Moscow, USA e ³Microbiology Laboratory, College of Agronomy, University of Idaho, Moscow, USA.

dois mililitros de água destilada estéril dentro do recipiente de alumínio sobre o farelo de Brassica, a placa foi imediatamente fechada e os bordos selados com Parafilm para se evitar o escape das substâncias voláteis. Cada espécie/variedade constituiu um tratamento e contou com 5 repetições, sendo utilizado como testemunha apenas água destilada estéril no recipiente de alumínio. As placas lacradas foram incubadas por 4 dias em BOD a 25°C. Após este período o recipiente de alumínio foi então retirado e as placas foram novamente lacradas e reincubadas por mais três dias. O crescimento radial do micélio foi mensurado diariamente. Após 7 dias a partir do início do experimento, as amostras com meio de cultura e micélio fúngico tratado foram repicadas para tubos de ensaio contendo BDA livre de qualquer outra substância, onde se pôde observar se o efeito inibidor do crescimento do micélio visualizado nas placas era fungistático ou fungicida. Esta última etapa do experimento foi realizada com três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

B. napus Dwarf Essex e *B. juncea* apresentaram ação fungitóxica contra *F. oxysporum* (Fig. 1). Há, entretanto, uma clara diferença entre a efetividade dos dois tratamentos, enquanto *B. napus* apenas retardou, em média, em 48 horas o desenvolvimento fúngico na maioria dos tratamentos, *B. napus* inibiu totalmente o crescimento do micélio fúngico em todos os isolados de *F. oxysporum* testados. A exceção ocorreu com o isolado 9243G, onde o crescimento do micélio fúngico foi totalmente inibido tanto por *B. juncea* quanto por *B. napus Dwarf Essex*. Os testes posteriores, onde parte das colônias fúngicas tratadas foram repicadas para BDA isento de produtos ativos, pode comprovar a morte das amostras tratadas com *B. juncea*.

De acordo com a literatura, espécies da família Brassicaceae produzem diferentes tipos de ITC que têm sido ao longo do tempo objeto de estudo de diversos pesquisadores. Smolinska e Horbowick (1999), avaliaram a liberação de propenil isotiocianato a partir de tecidos *B. juncea* e determinaram a correlação existente entre a presença deste composto e a inibição da germinação de clamidosporos de *F. oxysporum* var. *Radicis* f. sp. e comprovam o efeito fungitóxico da substância em teste. O efeito fungitóxico de isotiocianatos não é restrito a propenil isotiocianato e já foi relatado como muito eficiente no controle de conídios e clamidosporos para etil, pentenil, e benzil isotiocianatos, assim como os fenil e butil isotiocianatos apresentam-se como menos eficientes (Kirkegaard e Sarwar, 1999). Certamente a eficiência em controlar o crescimento do micélio fúngico é semelhante aos princípios de controle de conídios e clamidosporos estando estreitamente relacionada à natureza do grupamento R do isotiocianato. *B. juncea* produz altas concentrações de alil ITC, enquanto *B. napus* produz preferencialmente benzil ITC, não em níveis tão altos como os ITCs de *B. juncea*, que atuam de forma distinta sobre insetos e microorganismos. Provavelmente os níveis de ITCs ativos contra *F. oxysporum* encontram-se em maior concentração em *B. juncea*. A diferença significativa de efetividade entre duas variedades de mesma espécie (*B. napus Dwarf Essex* e *Athena*) sugere o quanto podem variar os níveis, a forma e o mecanismo de ação destas.

A sensibilidade diferenciada dos isolados também pode ser comprovada uma vez que o isolado 9243G teve seu crescimento totalmente inibido tanto por *B. juncea* quanto por *B. napus var. Dwarf Essex*. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Smolinska *et al* que avaliou a eficiência de diferentes isotiocianatos obtidos comercialmente e comprovou a maior sensibilidade deste mesmo iso-

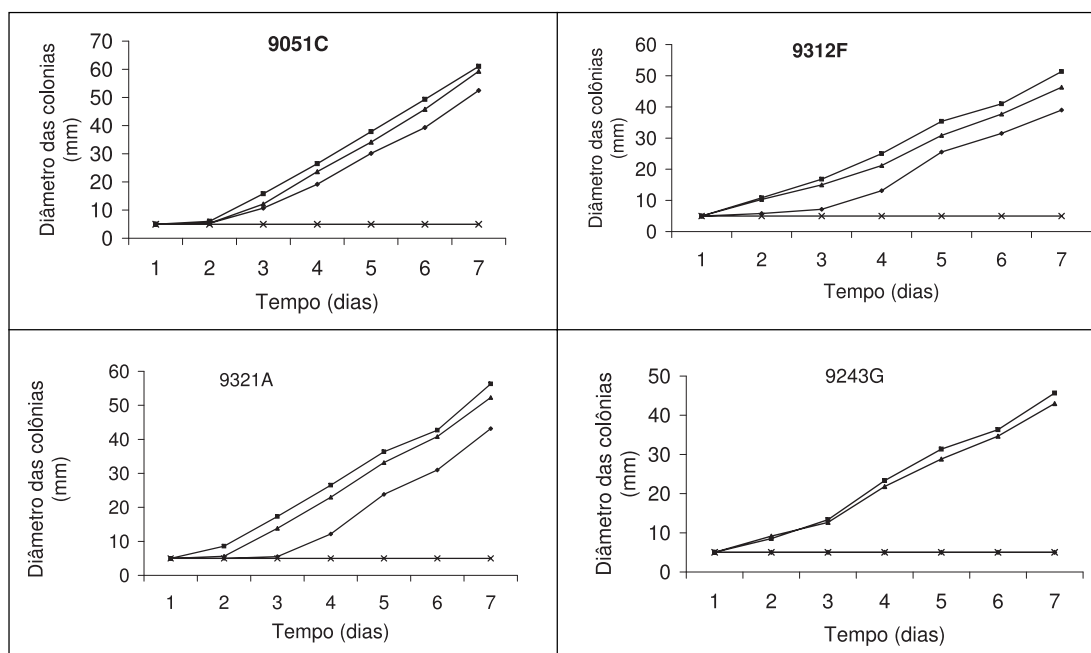


FIG. 1 - Atividade antifúngica de substâncias voláteis liberadas do farelo de *B. napus* var. *Dwarf Essex* (◆), *B. napus* var. *Athena* (■) e *B. juncea* (×), comparados ao controle: água destilada (▲) sobre quatro diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* 9051C, 9312F, 9321A e 9243G.

lado. Estes dados reforçam a necessidade de se buscar produtos menos tóxicos e específicos para a patologia em questão. Os resultados obtidos são extremamente promissores, uma vez *Brassica juncea* apresentou eficiente efeito fungicida contra *Fusarium oxysporum* 9321A e *B. napus* D. Ex atuou como fungistático nas concentrações testadas, comprovando a viabilidade de se utilizar plantas da família Brassicaceae para se controlar patologias. A liberação de isotiocianatos no solo a partir da incorporação de tecidos verdes de Brassica foi aferida por Morra, M.J. & Kirkegaard, (2002) indicando a viabilidade do uso deste material na redução da população de patógenos de solo.

Os efeitos, a princípio inócuos, observados para *B. napus* var. Athena não devem ser parâmetro para descartá-la de investigações futuras, resultados diferentes podem ser obtidos com outros agentes fitopatogênicos ou insetos praga. A busca por novos produtos menos tóxicos e que impliquem em menor efeito residual no ambiente deve nortear pesquisas em todo o mundo. Neste contexto a família Brassicaceae deve ser mais detidamente analisada, dada a diversidade de atividades biológicas atribuídas aos ITCs descritos na literatura e a eficiência dos mesmos.

REFERÊNCIAS

1. Bergamini Filho, A. & Kimati, H. A história da Fitopatologia in: Bergamini Filho, A. & Kimati, & Amorim, L. *Manual de Fitopatologia*, v.1, 3ª Ed. Editora Agronômica Ceres, SP, p.2-12,1995.
2. Campanhola, C. & Bettiol, W., *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. EMBRAPA - Jaguariúna, SP 279 p. 2003.
3. Borek, V. Elberson, L.P. McCaffrey, J.P. Morra, M.J. Toxicity of aliphatic and aromatic isothiocyanates to eggs of the black vine weevil (Coleoptera:Curculionidae). *J.Econ. Entomol.*, v. 88, p. 1192-1196, 1995.
4. Borek, V., Elberson, L.P. McCaffrey, J.P. Morra, M.J. Toxicity of rapeseed meal and methyl isothiocyanate to larvae of the black vine weevil (Coleoptera:Curculionidae). *J.Econ. Entomol.*, v. 90, p. 109-112, 1997.
5. Brown, P.D., and M.J. Morra. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Adv. Agron.*, v. 61, p.167-231, 1997.
6. Brown, P.D., M.J. Morra, and V. Borek. Gas chromatography of allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *J. Agric. Food Chem.*, v 42, p. 2029-2034, 1994.
7. Dandurand, L.M. Mosher, R.D. Knudsen, G.R. Combined effects of *Brassica napus* seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Can. J. Microbiol.*, v. 46, p.1051-1057, 2000.
8. Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Angus, J.F., and Koetz, E. Effect of *Brassica* Break Crops on the Growth and Yield of Wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 45: 529-545, 1994.
9. Kirkegaard, J. A. & Sarwar, M. Glucosinolates profiles of Australian canola (*Brassica napus* annua L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: implications for biofumigation. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 50, p. 315-324, 1999.
10. Morra, M.J. & Kirkegaard, J.A.. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biol. Biochem.* 34:1683-1690, 2002.
11. Smolinska, U. & Horbowick, M. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, v. 147, p. 119-124, 1999.
12. Smolinska, U., M.J. Morra, G.R. Knudsen and R.L. James. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease* v. 87:407-412, 2003.

Endereço para correspondência
Rua Jardim Botânico, 1008, CEP
E-mail: marcia@jbrj.gov.br