

EFEITO DO EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE TOMILHO NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO MICELIAL DE *Cercospora coffeicola*

PEREIRA, R.B.¹; LUCAS, G.C.²; ALVES, E.³; BOTELHO, A.O.⁴; FERREIRA, J.B.⁵

¹Doutorando em Fitopatologia, Bolsista PG/CNPq, Depto. de Fitopatologia,, UFLA, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: ricardoborgespereira@yahoo.com.br; ² Aluna do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ³ Prof. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ⁴ Bolsista CNPQ, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ⁵ Prof. Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal do Acre, Cruzeiro do Sul, AC

Resumo:

A cercosporiose é uma das doenças de maior importância no cafeeiro, afetando desde mudas a plantas adultas no campo. O objetivo deste trabalho foi: avaliar o efeito do extrato de casca de café (ECC 200, 150, 100, 50 e 10g.L⁻¹) e óleo de tomilho (OET 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm) na germinação e crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*. O ECC não apresentou efeito fungitóxico ao fungo, diferentemente do OET, que reduziu em 27%, 30% e 45% a germinação dos conídios, nas concentrações de 500, 1000 e 2000ppm, respectivamente. Todas as diluições do ECC e OET exerceram efeito inibitório ao crescimento micelial de *C. coffeicola*, em relação à testemunha.

Palavras-chave: Fungitóxico, óleo essencial.

EFFECT OF COFFEE PEEL EXTRACT AND THYME OIL IN THE GERMINATION AND MICELIAL GROWTH OF *Cercospora coffeicola*

Abstract:

Brown-eye spot is one of the most important coffee diseases, affecting both plantlets and adult trees in the field. The objective of this work was to assess the effect of the coffee peel extract (CPE 200, 150, 100, 50 and 10 g.L⁻¹) and thyme oil (TEO 2000, 1000, 500, 250 and 125 ppm) in the germination and mycelial growth of *Cercospora coffeicola*. The CPE didn't present any fungitoxic effect, contrasting with TEO that reduced in 27, 30 and 45% the germination of the conidia in the concentrations of 500, 1000 and 2000 ppm, respectively. All dilutions of CPE and TEO had inhibitory effect in the mycelial growth of *C. coffeicola* in comparison with the control treatment.

Keywords: Fungitoxic, essential oil.

Introdução

A cercosporiose, uma das mais importantes doenças do cafeeiro. Causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, esta doença pode causar sérios prejuízos econômicos, tanto na formação de mudas em viveiro, como em lavouras no campo. A doença causa intensa desfolha da planta, reduzindo a produção, além de prejuízos pela depreciação da qualidade da bebida do café (Chalfoun, 1997). Ataques intensos de doenças no campo ocorrem, principalmente, em regiões mais altas e de baixa fertilidade natural, chegando a causar perdas de 30% na produção (Carvalho & Chalfoun, 2001).

Vários trabalhos demonstram a eficiência de extratos vegetais no controle de fitopatógenos, como cercosporiose e a ferrugem do cafeeiro (Santos, 2006). Óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm demonstrado eficiência no controle de doenças, tanto por sua ação fungitóxica, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos (Almada et al., 1998; Zambonelli et al., 1996), quanto pela presença de compostos eliciadores. O objetivo deste trabalho foi: avaliar o efeito de diferentes doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (OET) na germinação e no crescimento micelial de *C. coffeicola*.

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, MG.

O ECC foi obtido por meio de cascas de frutos de café (pericarpo) provenientes de lavoura em cultivo orgânico. Estas foram secas em estufa a 60°C por 48 horas e moídas até a obtenção de uma fração fina, em seguida, 100gramas dessa fração foram re-suspensos em 500mL de água destilada e a suspensão foi conduzida à extração a quente (fervura), por 2 horas, sob refluxo. Após o tempo de extração, a suspensão foi filtrada a vácuo e teve seu volume completado para 500mL com água destilada. Seguiu-se o armazenamento em freezer a -20°C até a utilização experimental. Este extrato foi então,

denominado ECC 200g.L⁻¹, do qual partiram as demais diluições testadas.

O inóculo de *Cercospora coffeicola* foi obtido de plantas naturalmente infectadas, provenientes de lavouras localizadas no Setor de Cafeicultura, no Campus da UFLA. Folhas com sintomas foram coletadas, lavadas superficialmente em água corrente e submetidas a câmara úmida por três dias, para a esporulação do fungo. Os conídios formados foram, então, destacados da superfície foliar com pincel de cerdas macias e água destilada.

Posteriormente, a suspensão de conídios foi filtrada em camada dupla de gaze e teve sua concentração ajustada para $1,5 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹, em câmara de contagem.

Ensaio I: Efeito do ECC e OET sobre a germinação de conídio de *C. coffeicola*

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito fungitóxico do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a germinação de conídios de *C. coffeicola*. Os tratamentos consistiram de extrato de casca de café a 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹ e óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram também adicionadas uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹) e uma testemunha com água destilada.

Foram utilizadas placas de Petri estéreis, de 6cm de diâmetro, às quais foi adicionado, previamente, meio AA (ágar-água) 2%. Em seguida, adicionaram-se 10mL das soluções constituintes dos tratamentos nas placas e 1mL da suspensão de conídios a $1,5 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹. A suspensão de conídios foi, então, espalhada com alça de Drigalski e as placas acondicionadas em BOD a 25°C, onde permaneceram por 24 horas, com fotoperíodo de 12 horas.

Para cada tratamento, utilizaram-se duas placas, as quais foram divididas em quatro quadrantes, sendo avaliados 30 conídios por quadrante, num total de oito repetições.

Após a incubação, a germinação foi paralisada com solução de lactoglicerol e, em microscópio de luz, foi avaliada a porcentagem de germinação dos conídios.

Ensaio II: Efeito do ECC e OET sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito fungitóxico do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*. Testou-se o extrato de casca de café nas diluições de 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹ e o óleo essencial de tomilho nas diluições de 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram também adicionadas uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹), uma testemunha somente com água destilada e uma testemunha com 2% de propilenoglicol.

Para a realização do experimento, foram utilizadas placas de Petri estéreis de 9cm de diâmetro e meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) 2%. O meio de cultura foi preparado em etapas. Primeiramente, a batata foi descascada, picada, fervida em água destilada e, em seguida, o caldo coado. O caldo da batata foi separado em quantidades iguais, colocando-se 125mL em cada erlenmayer de 250mL, ao qual também foram adicionados ágar e dextrose. Em seguida, foram autoclavados.

O extrato de casca de café e óleo de tomilho foram diluídos em água estéril. Os meios de cultura autoclavados foram fundidos e, após queda da temperatura (40°C), acrescidos de 125mL das soluções, completando, assim, o volume para 250mL, de modo que as diluições finais atingissem as pré-estabelecidas pelo ensaio. Nos tratamentos que consistiam de óleo essencial de tomilho, adicionaram-se ao meio, no momento da mistura, 2% de propilenoglicol (surfactante). Na testemunha, utilizou-se apenas água estéril. Após a adição dos tratamentos, cada meio foi homogeneizado e vertido em oito placas. Cada placa foi inoculada no centro, com um disco de 6mm de diâmetro contendo micélio de *C. coffeicola*, posicionado de modo que o fungo entrasse diretamente em contato com o meio. Em seguida, as placas foram acondicionadas em BOD a 25°C, onde permaneceram até o final das avaliações, com fotoperíodo de 12 horas.

O ensaio estabelecido foi o de delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa.

Foram realizadas avaliações de quatro em quatro dias após a inoculação e, em seguida, calculado o índice de crescimento micelial (ICM), determinado pela adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}$$

Em que:

ICM = índice de crescimento micelial;

C₁, C₂, C_n = diâmetro do micélio na primeira, segunda e última avaliação; e

N₁, N₂, N_n = número de dias após a inoculação.

As análises estatísticas foram realizadas em software estatístico SISVAR v. 4.3 Build 45, do Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 1999-2004. Para os testes de médias, foram utilizados os testes de Scott Knott e Tukey. Para a confecção dos gráficos de regressão, utilizou-se o programa Excel, do Microsoft Office XP, 2003.

Resultados e discussão

Ensaio I: Efeito do ECC e OET sobre a germinação de conídio de *C. coffeicola*

O ECC 100g.L⁻¹, 150g.L⁻¹ e 200g.L⁻¹ apresentaram um aumento na germinação de conídios de *C. coffeicola*, de 8,0%, 5,4% e 6,9%, respectivamente, em relação à testemunha (dose 0). Neste caso, as respostas foram as mesmas para as três concentrações. De acordo com a Figura 1A, o ECC contribuiu para a germinação provavelmente por este apresentar em sua fração solúvel, quantidades significativas de carboidratos e proteínas extraídas da casca dos frutos de café, estimulando assim, a germinação.

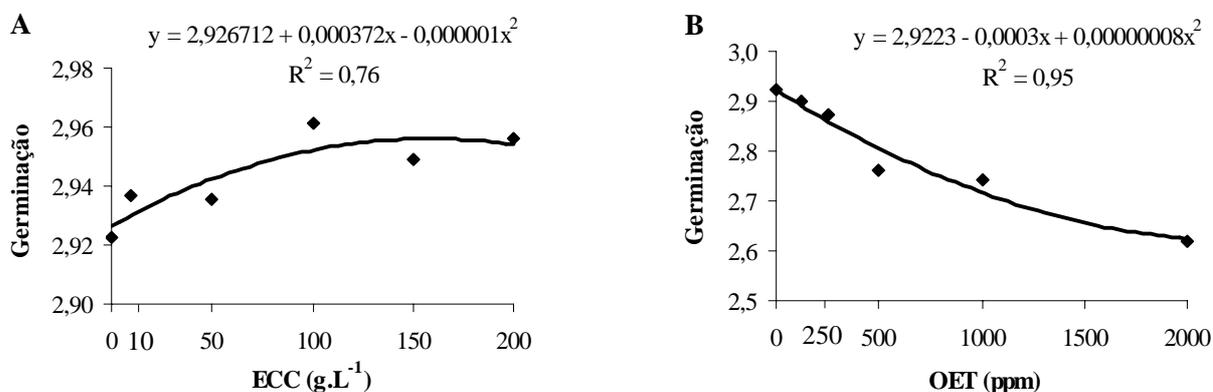


Figura 1 – Germinação de *C. coffeicola* em função de diferentes concentrações de ECC (0, 10, 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹) (A) e OET (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000ppm) (B). Dados (%) transformados para arcosen da \sqrt{x} .

De acordo com a Figura 1B, os tratamentos constituídos de OET 500ppm, 1000ppm e 2000ppm apresentaram uma redução de 28%, 30,0% e 45% na germinação, respectivamente, em relação à testemunha. No entanto, o OET 2000ppm afetou ainda mais a germinação dos conídios, em relação às concentrações de 500ppm e 1000ppm, que apresentaram mesmas respostas. O OET apresentou efeito inibitório à germinação, a medida em que se aumentou a concentração do óleo, caracterizando um efeito tóxico ao fungo. A DL₅₀ do OET, para a germinação de conídios de *C. coffeicola* foi estimada pela equação de regressão da Figura 1B em 4440ppm.

Ensaio II: Efeito do ECC e OET sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*

Todas as doses do ECC apresentaram redução no índice de crescimento micelial (ICM), em relação à testemunha, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade (Figura 2A). Neste caso, o ECC 150g.L⁻¹ e 200g.L⁻¹ apresentaram as maiores inibições de 27% e 30%, admitindo mesma resposta, seguidos do ECC 50g.L⁻¹, 100g.L⁻¹ com 19% e 22%, e do ECC 10g.L⁻¹ com inibição de 9%.

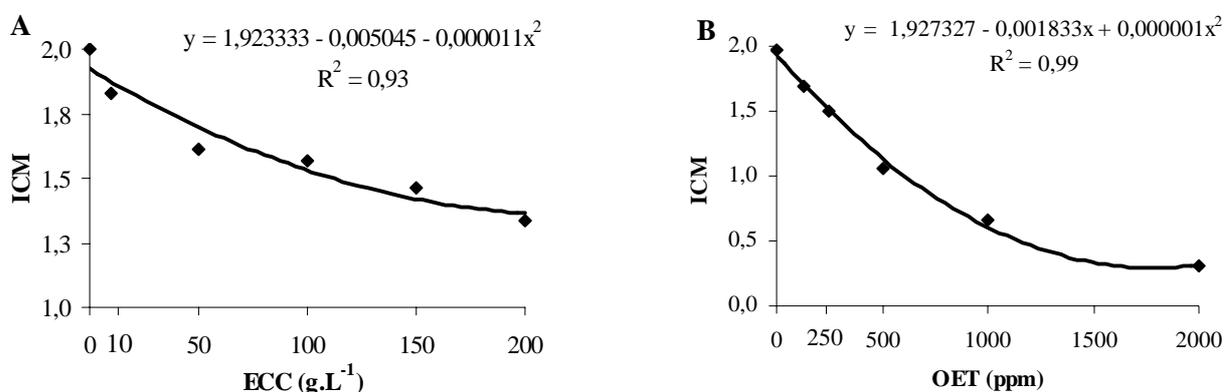


Figura 2 – Índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola* em função de diferentes concentrações de ECC (0, 10, 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹) (A) e OET (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000ppm) (B).

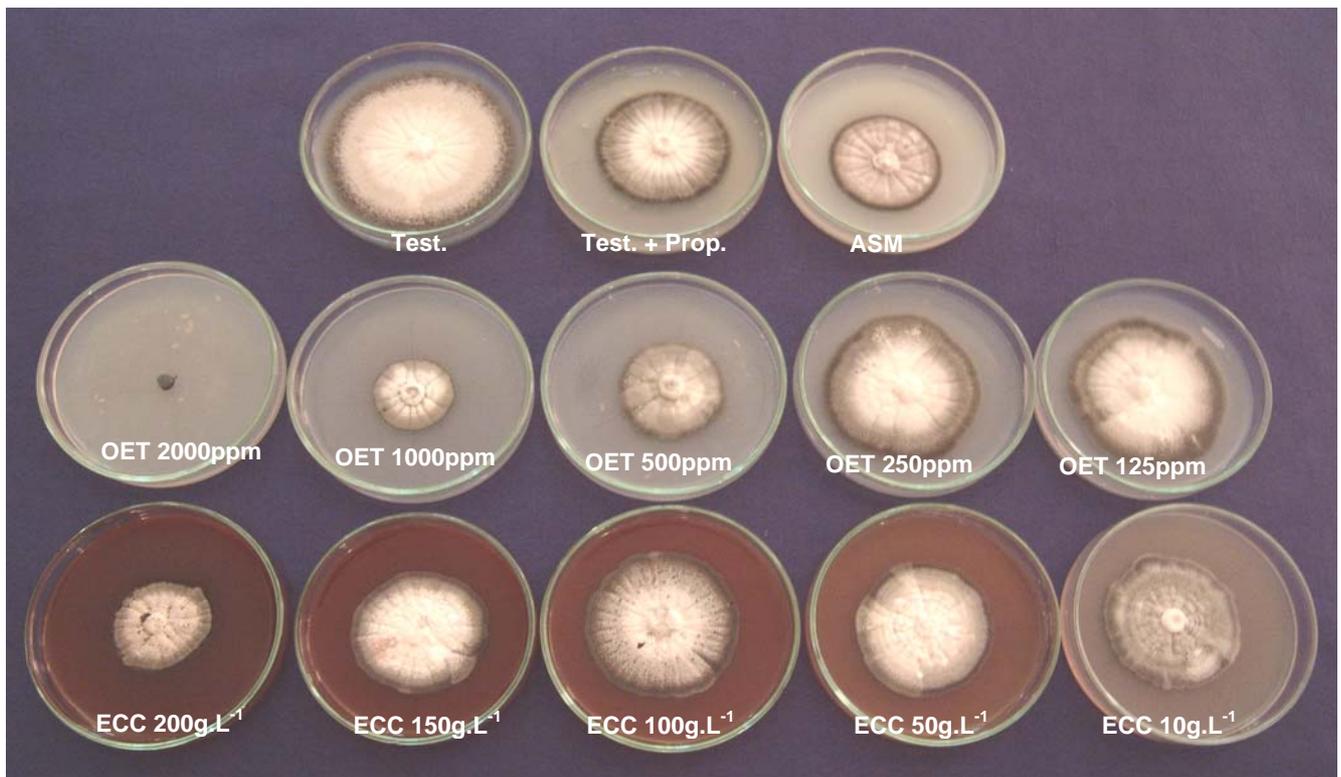


Figura 3. Efeito do óleo essencial de tomilho (OET), extrato de casca de frutos de café (ECC) e ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$, testemunha (Test.) e testemunha mais 2% de propilenoglicol (surfactante) (Test. + Prop.) sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*.

Todas as doses do OET apresentaram redução do ICM de em relação à testemunha (Figura 2B). Neste caso, o OET nas concentrações de 125ppm, 250 ppm, 500ppm, 1000ppm e 2000ppm, apresentaram inibição no crescimento micelial de 14%, 24%, 46%, 66% e 84%, respectivamente, em relação à testemunha, apresentando todos respostas diferentes entre si. O crescimento micelial foi diretamente afetado pelo ECC e OET, caracterizando um efeito tóxico. A DL_{50} do ECC, e OET para o crescimento micelial de *C. coffeicola* foi estimada pela equação de regressão da Figura 2A e 2B em 410g.L^{-1} e 621ppm , respectivamente.

Apesar do ECC estimular a germinação de conídios, reduziu o crescimento micelial de *C. coffeicola*. Além disso, já foi relatado como indutor de resistência (Pereira, 2006) assim mostra ser uma importante ferramenta para o controle de doenças de plantas.

Conclusões

O ECC aumentou a germinação de conídios, no entanto, reduziu significativamente o crescimento fúngico. Verificou-se efeito fungitóxico do OET sob a germinação e o crescimento micelial de conídios de *C. coffeicola*.

Referências Bibliográficas:

ALMADA, C.B.J.; LIMA.C.Z.R.L,Z; POSSAMAI, C.J. Controle alternativo do Míldio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk e Curt) em pepino (*Cucumis sativus* L). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23 p.294, ago. 1998. (Resumo).

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **Cercospora**: doença do cafeeiro também chamada de "olho-pardo" ou "olho-de-pomba. Lavras, 2001. (Informe Tecnológico, 26).

CHALFOUN, S.M. **Doenças do cafeeiro**: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selectio and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.

PEREIRA, R.B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro.** 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, F.S. **Epidemiologia e manejo de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob cultivo orgânico.** 2006. 146p. Tese (Doutorado de Fitopatologia) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v.144, p.491-494, 1996.