

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

**Avaliação de compostos químicos sobre o crescimento micelial  
de *Colletotrichum fructicola* da mandioca (*Manihot esculenta*  
Crantz) *in vitro***

**DIEGO ANDRADE SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JULHO-2022**

**Avaliação de compostos químicos sobre o crescimento micelial  
de *Colletotrichum fructicola* da mandioca (*Manihot esculenta*  
Crantz) *in vitro***

**DIEGO ANDRADE SANTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança

Co-Orientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira


**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO-2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DE DIEGO ANDRADE SANTOS**

Prof. DSc. Carlos Augusto Dórea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



DSc. Maria Selma Alves Silva Diamantino  
Especialista Visitante – Embrapa Mandioca e Fruticultura

MSc. Julielton Santos Da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO-2022**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO .....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	13

## RESUMO

### Avaliação de compostos químicos sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro*

A antracnose da mandioca (*Colletotrichum* spp.) é uma doença altamente destrutiva, sobretudo em condições ambientais favoráveis e em hospedeiros susceptíveis. O controle químico está entre as estratégias mais adequadas para o manejo desta doença. Ademais, busca-se alternativas de controle deste patógeno por meio do uso de compostos com ações fungicidas e capazes de induzir mecanismos de resistência sistêmica em planta. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do fosfito de potássio e do glicerol sobre o crescimento micelial do *C. fructicola*. Para tanto, o experimento consistiu na avaliação *in vitro* do crescimento micelial de *C. fructicola* em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e seis repetições, sendo eles: controle negativo (água), três concentrações de glicerol (1%, 3% e 5%) e em três concentrações fosfito de potássio FITOATIV® 28% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 26% K<sub>2</sub>O (10ml/L, 30ml/L e 50ml/L). Para a avaliação, foi mensurado o diâmetro micelial (DM) e posteriormente convertido em porcentual de inibição de crescimento micelial (PICM), seguido da análise estatística com o teste de Tukey (p<0,05). O fosfito de potássio a 50 ml/L apresentou o melhor resultado, com PICM de 56,30% (DM ≈ 39,33mm), seguido do glicerol a 5% com o PICM de 16,76% (DM ≈ 74.92mm). Portanto, os resultados indicam que ambos os compostos apresentam potenciais para o controle, no entanto o fosfito de potássio (50ml/L), apresentou maior poder de inibição sobre o crescimento micelial do *C. fructicola* e indicam a necessidade de novos estudos para avaliar os compostos em mais concentrações e na interação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: antracnose, controle, indutores de resistência, fosfito de potássio, glicerol.

## ABSTRACT

Evaluation of chemical compounds on mycelial growth of *Colletotrichum fructicola* of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro*

Anthrachnose of cassava (*Colletotrichum* spp.) is a highly destructive disease, especially under favorable environmental conditions and on susceptible hosts. Chemical control is among the most appropriate strategies for the management of this disease. Moreover, alternatives to control this pathogen through the use of compounds with fungicidal actions and capable of inducing systemic resistance mechanisms in plants are being sought. Therefore, the objective of this work was to evaluate the action of potassium phosphite and glycerol on the mycelial growth of *C. fructicola*. The experiment consisted in the evaluation *in vitro* of the mycelial growth of *C. fructicola* in an entirely randomized design, with seven treatments and six repetitions, as follows: negative control (water), three concentrations of glycerol (1%, 3% and 5%) and three concentrations of FITOATIV® potassium phosphite 28% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 26% K<sub>2</sub>O (10ml/L, 30ml/L and 50ml/L). For the evaluation, the mycelial diameter (MD) was measured and later converted into percentage of mycelial growth inhibition (PMGI), followed by statistical analysis with Tukey's test (p<0.05). Potassium phosphite at 50 ml/L showed the best result, with PMGI of 56.30% (MD ≈ 39.33 mm), followed by 5% glycerol with the PMGI of 16.76% (MD ≈ 74.92 mm). Therefore, the results indicate that both compounds present potentials for control, however potassium phosphite (50ml/L), showed greater inhibition power on the mycelial growth of *C. fructicola* and indicate the need for further studies to evaluate the compounds in more concentrations and in pathogen-host interaction.

Keywords: anthracnose, control, resistance inducers, potassium phosphite, glycerol.

## INTRODUÇÃO

*Colletotrichum* é um gênero do filo Ascomycota e classe Sordatiomycetes que abrange diversas espécies fúngicas causadoras da antracnose (Dean et al. 2012). Essa doença afeta a produtividade de uma ampla gama de plantas cultivadas, incluindo a mandioca, que é uma cultura de importância econômica e social cultivada na maioria dos países localizados nos trópicos, devido seu elevado valor energético e rusticidade (Ceballos et al. 2020). No Brasil, segundo Oliveira et al. (2020), a cultura é acometida por um complexo de espécies, sendo a espécie *Colletotrichum fructicola* provavelmente a mais frequente.

Essa doença é altamente destrutiva na mandiocultura e preocupa cada vez mais os produtores, pois a depender das condições ambientais favoráveis e susceptibilidade da planta, pode causar sintomas como cancrios nas hastes, ramos e frutos, além de manchas foliares e em estágios mais avançados, morte descendente das plantas (Nestor et al. 2018).

Para o controle dessa doença, o controle químico e a resistência varietal estão entre as poucas alternativas disponíveis para cultura, sendo que atualmente existem 10 produtos comerciais registrados para o controle químico no Brasil, dos quais 70% são compostos por estrobilurinas ou triazóis, isoladamente ou em misturas (AGROFIT, 2022). Porém, a longo prazo os fungicidas que possuem ação em sítios específicos podem se tornar ineficientes por selecionar os fitopatógenos resistentes, além de causarem impactos ambientais significativos pela deposição de resíduos no solo quando utilizados de forma inadequada (Gogbeu et al. 2015). Neste cenário, entende-se a necessidade de desenvolver novos métodos de controle, que sejam tão eficazes quanto o manejo já aplicado e que cause menos impactos ambientais quando comparados aos fungicidas convencionais.

Dentre as possíveis estratégias está o uso de compostos químicos sintéticos, que além redução do crescimento micelial e o potencial de indução de resistência vegetal

como abordado no trabalho de Motoyama et al. (2003). Essa pesquisa avaliou o indutor comercial Ecolife®, e verificou que o produto apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum lagenarium*. Já Ogoshi et al. (2013) testaram doses de fosfito de potássio e obtiveram resultados satisfatórios na redução do crescimento micelial, inibição da formação de apressórios e da germinação conidial do *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, assim como Silva et al. (2015) que também utilizaram o fosfito de potássio e conseguiram inibir o crescimento micelial e a germinação de conídios do *Colletotrichum lindemuthianum* em 100% do *in vitro*.

Entretanto trabalhos que testem o potencial fungistático/fungicida de indutores de resistência, como fosfito de potássio e o glicerol, contra o *C. fructicola* são ausentes. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* o potencial fungistático de indutores de resistência de plantas (glicerol e fosfito de potássio) sobre o crescimento micelial de *C. fructicola*. Esse trabalho fornecerá informações para desenvolver trabalhos *in vitro* e *in vivo* que proporcionem novas estratégias para o manejo da antracnose na mandioca.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Hermes Peixoto Santos Filho da Embrapa Mandioca e Fruticultura localizada em Cruz das Almas, Bahia e o isolado utilizado foi o *Colletotrichum fructicola* (PPAM-13) oriundo da micoteca fitopatológica do laboratório.

O trabalho foi realizado com delineamento inteiramente casualizado, para cada um dos tratamentos, foram utilizadas seis repetições. O controle negativo foi realizado com adição de apenas o meio de cultura BDA - Batata Dextrose Ágar (T1). Foram utilizados dois compostos químicos indutores nos tratamentos sendo: o glicerol nas concentrações de



1%(T2), 3%(T3) e 5%(T4); e o fosfito de potássio 00-28-26 (28% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 26% K<sub>2</sub>O) nas concentrações de 10 mL/L(T5), 30 ml/L (T6) e 50 ml/L (T7).

No tratamento com glicerol (T2,T3 e T4), foram adicionados, 50 µL do composto com uma pipeta em placas de Petri (90mm de diâmetro) contendo BDA, e logo em seguida a porção pipetada foi espalhado na superfície do meio de cultura, com auxílio de uma alça de Drigalski. Nos demais tratamentos (T5, T6 e T7), os compostos foram adicionadas no meio de cultura BDA semi-fudente e distribuídos em placas de Petri.

Utilizando a metodologia de Bompeix & Saindrenan (1984) adaptada para o experimento, a partir de colônias do *Colletotrichum fructicola*, com sete dias de cultivo, foram retirados discos de micélio de aproximadamente 0,6 cm de diâmetro dos bordos das colônias. Estes discos, individualmente, foram inseridos no centro das placas de cada tratamento e posteriormente incubadas durante 9 dias à 27°C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada com a mensuração do diâmetro micelial (DM) utilizando uma régua milimetrada em dois sentidos, perpendicularmente opostos, aos três, cinco, sete e nove dias após a repicagem e em seguida calculou-se a média dos diâmetros mensurados nos dois sentidos.

A partir do DM médio em cada tratamento, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial por meio, da equação também utilizada por Menten et al. (1976) :

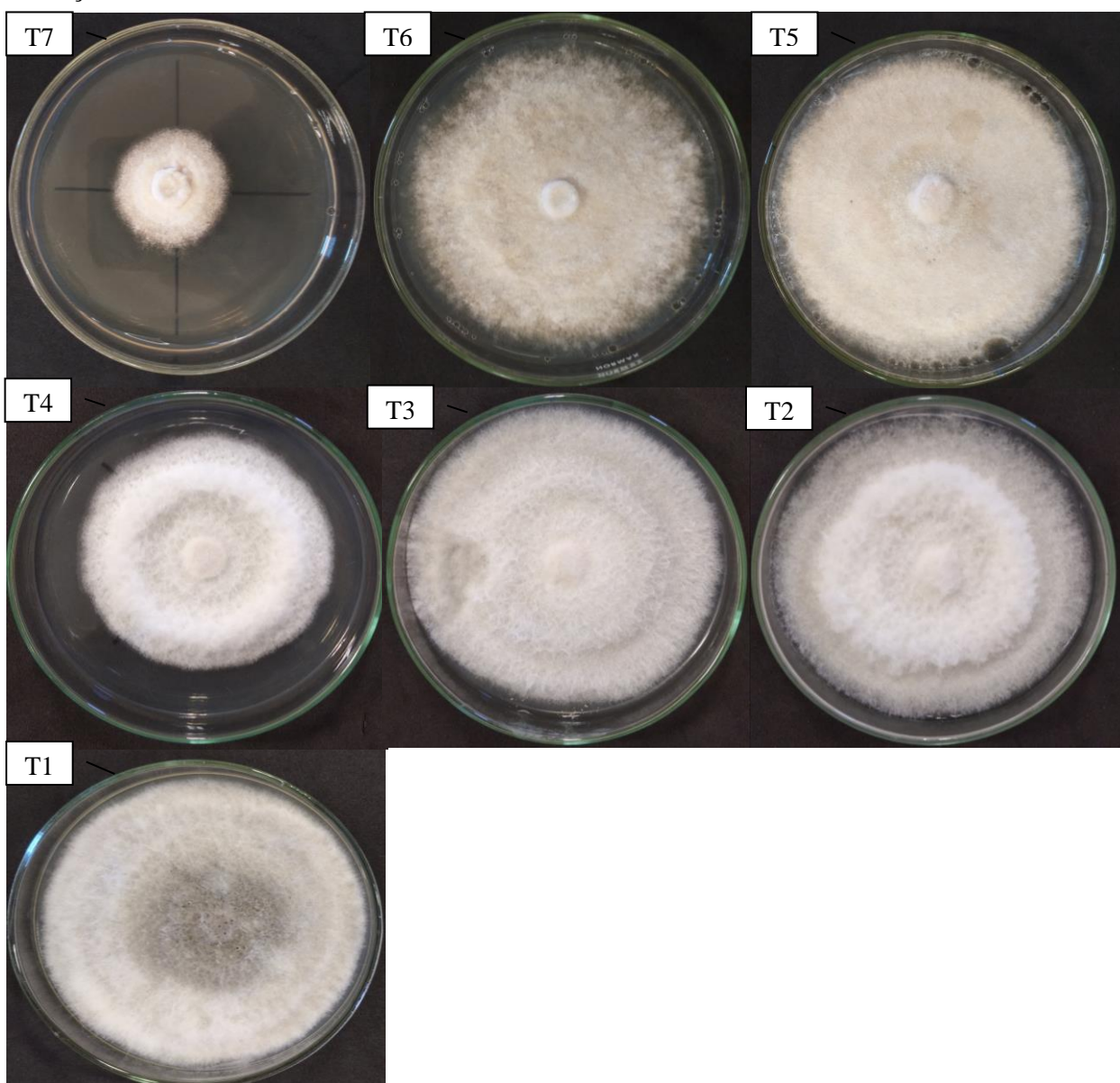
$$PICM = \frac{\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}}{\text{Diâmetro da testemunha}} \times 100$$

E para comparar as médias do DM entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey (p<0,05) com auxílio do programa estatístico R 4.2.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fosfito de potássio e o glicerol apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *C. fructicola* nas concentrações máximas testadas (Figura 1).

Figura 1. Crescimento micelial radial de *Colletotrichum fructicola* *in vitro* obtido na quarta avaliação.



Tratamentos: T1 – Testemunha negativa - água destilada esterilizada; T2 – Glicerol 1%, T3 – Glicerol 3%; T4 – Glicerol 5%; T5 – Fosfito de potássio 10ml/L; T6 – Fosfito de potássio 30ml/L e T7 – Fosfito de potássio 50ml/L.

O fosfito de potássio na concentração de 50ml/L alcançou maior porcentagem de inibição com redução do crescimento micelial em 56,30% e DM médio de 39.33 mm diferindo estatisticamente do glicerol na concentração de 5% que reduziu o crescimento micelial em 16,76% com DM médio de 74.92 mm respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de indutores de resistência com diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *C. fructicola*.

Tratamentos	DM médio (mm)	Grupos*	PICM (%)
Fosfito 50ml/L	39.33	a	56.30
Glicerol 5%	74.92	b	16.76
Fosfito 30ml/L	83.25	c	7.50
Glicerol 3%	87.42	d	2.87
Glicerol 1%	89.5	d	0.55
Fosfito 10ml/L	90	d	0
Controle	90	d	0
CV	2.83%		

\*Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra, não difere significativamente de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade. DM = Diâmetro micelial e PICM = porcentagem de inibição do crescimento micelial.

O efeito deletério direto do fosfito de potássio é relatado em diferentes espécies fúngicas, como na inibição do crescimento micelial do *C. gloeosporioides* isolado de macieira (*Malus domestica*) relatado por Araújo et al. (2008), assim como do *C. tamarilloi* isolado do jiló (*Solanum aethiopicum*) registrado por Alexandre et al. (2014) e no retardamento do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* isolado da soja (*Glycine max*) estudado por Camochena et al. (2020).

O efeito inibitório do fosfito de potássio sobre o crescimento micelial fúngico é proposto por Schurt et al. (2013) como uma possível interferência do aspecto salino do composto sobre o balanço osmótico do fungo. Já Araújo et al. (2008) sugerem que o efeito é devido a característica ácida do produto, a qual interfere diretamente no crescimento micelial em virtude do desequilíbrio do pH.

Em contraste, o glicerol como fungicida é ainda pouco estudado. A ação inibitória constada no presente trabalho tem como provável explicação a formação de uma barreira física e química na superfície do meio de cultura tornando os nutrientes menos acessíveis ao fungo. A justificativa está atrelada a dificuldade do fungo em catabolizar a complexa cadeia de carbono do composto para sua absorção, efeito análogo ao de utilizar o glicerol em alta concentração em microorganismos para sua preservação (Santos et al. 2015).

Ambos os compostos apresentaram ação direta sobre o desenvolvimento do fungo, além disso apresentam vantagens econômicas, ambientais e como indutores de resistência. Em relação a vantagem econômica, o glicerol é subproduto gerado na produção do biodiesel e com a diversificação da matriz energética brasileira, torna-se um material mais disponível e com preço competitivo, logo, seu uso reduz os custos no manejo de antracnose (Medeiros et al. 2010). No que diz respeito a redução do impacto ambiental, o fosfito comparado à fungicidas convencionais apresenta menos riscos à saúde humana e também ao meio ambiente (Kromann et al. 2012). Além dessas vantagens, assim como o fosfito, o glicerol também vem sendo frequentemente estudado como promissor indutor de mecanismos de resistência contra doenças fúngicas (Costa et al. 2018, Figueira et al. 2020, Li et al. 2016, Zhang et al. 2015).

## CONCLUSÃO

-Fosfito de potássio e glicerol nas concentrações mais elevadas testadas apresentam potencial fungistático.

-Fosfito de potássio (50 ml/L) apresentou maior percentual de inibição de crescimento micelial dentre os compostos e concentrações testadas.

-Novos estudos tanto *in vitro* como *in vivo* são necessários para avaliar outras concentrações dos compostos sobre *Colletotrichum fructicola* bem como o potencial destes compostos na indução de resistência sistêmica em plantas de mandioca.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT (2022). Disponível em <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acessado em 05 de julho de 2022.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J.; BORSATO, L.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology*. v.33, n.2, p.148-152, 2008.
- ALEXANDRE, E. R.; HERCULANO, L. M.; SILVA, J. M. D.; OLIVEIRA S. M. A. D. Fosfitos no manejo da antracnose do jiló. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 930-938, 2014.
- BOMPEIX, G.; SAINDRENAN, P. *In vitro* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid on *Phytophthora* species. *Fruits* 39, 777-786, 1984.
- CAMOCHENA, R. C.; STEILMAN, P.; SANTOS, I. D.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; OLIVEIRA, M. D. C. Ação de fosfitos de potássio no manejo de mofo branco em soja. *Summa Phytopathologica*, 46, 260-266, 2020.
- CEBALLOS, H.; ROJANARIDPICHEDE, C.; PHUMICHAI, C.; BECERRA, L. A.; KITTIPADAKUL, P.; IGLESIAS, C.; GRACEN, V. E. Excellence in cassava breeding: perspectives for the future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2(2), 2020.
- COSTA, B. H. G.; RESENDE, M. L. V.; MONTEIRO, A. C. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; BOTELHO, D. M. D. S.; SILVA, B. M. D. Potassium phosphites in the protection of

common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. *Journal of Phytopathology*, 166(2), 95-102, 2018.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK K. E.; DI PIETRO, A. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, pp. 414-430, 2012.

FIGUEIRA, E. P. P.; KUHN, O. J., MARTINAZZO-PORTZ, T.; STANGARLIN, J. R.; PEREIRA, M. D. P.; LAMPUGNANI, C. Histochemical changes induced by *Trichoderma* spp. and potassium phosphite in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in response to the attack by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(3), 811-828, 2020.

GOGBEU, S. J.; SEKOU, D.; KOUAKOU, K. J.; DOGBO D. O.; BEKRO Y-A. Improvement of cassava resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* by salicylic acid, phosphorous acid and fungicide Sumi 8. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4:854–865, 2015.

KROMANN, P.; PÉREZ, W. G.; TAIPE, A.; SCHULTE-GELDERMANN, E.; SHARMA, B. P.; ANDRADE-PIEDRA, J. L.; FORBES, G. A. Use of phosphonate to manage foliar potato late blight in developing countries. *Plant disease*, 96(7), 1008-1015, 2012.

LI, Y.; SONG N.; ZHAO, C.; LI, F.; GENG, M.; WANG, Y.; LIU, W.; XIE, C.; SUN, Q. Application of glycerol for induced powdery mildew resistance in *Triticum aestivum* L. *Frontiers in physiology*, 7, 413, 2016.

MEDEIROS, M. A.; OLIVEIRA, D. L.; SANSIVEIRO, M. T.; ARAÚJO, M. H.; LAGO, R. M. Use of the glycerol by-product of biodiesel to modify the surface of expanded vermiculite to produce an efficient oil absorbent. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(4), 447-452, 2010.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (tass.) Goid. *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira* 1:57-64, 1976.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORITUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, vol. 25, no. 2, pp. 491-496, 2003.

NESTOR, E. K. J.; CÉLESTINE, T. H. M. A.; GASTON, K. K.; KOUABENAN, A.; DAOUDA, K. Identification and Characterizations of Pathogenic Fungal Species

Associated with Symptoms of Cassava Anthracnose in Ivory Coast. *Annual Research & Review in Biology*, 1-9, 2018.

OGOSHI, C.; ABREU, M. S.; SILVA, B. M.; SANTOS NETO, H.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V. Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. *Bioscience Journal*, v.29, p.1558-1565, 2013.

OLIVEIRA, S. A. S.; SILVA, L. L.; NASCIMENTO, D. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA T. A. S. *Colletotrichum* species causing cassava (*Manihot esculenta* Crantz) anthracnose in different eco-zones within the Recôncavo Region of Bahia, Brazil. *J Plant Dis Protect*, 127:411–416, 2020.

SANTOS, G. F.; LOCATELLI, G. O.; COÊLHO, D. A.; BOTELHO, P. S.; AMORIM, M. S.; VASCONCELOS, T. C. L.; BUENO, L. A. Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 75, 345–352, 2015.

SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. Á.; SOUZA, N. F. A.; REIS, R. D. Eficiência de diferentes moléculas na redução dos sintomas da queima das bainhas em arroz e no crescimento de *Rhizoctonia solani* *in vitro*. *Revista Ceres*, 60, 221-225, 2013.

SILVA, J. L.; SOUZA, P. E.; ALVES, E.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FREITAS, M. L. O.; ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, M. L. V. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. *Journal of Medicinal Plant Research*, 9, 243–253, 2015.

ZHANG, Y.; SMITH, P.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J. Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular plant pathology*, 16(1), 27-37, 2015.

