

Área do conhecimento: 2.03.03 - Botânica / Fisiologia Vegetal.

## **FITOTOXICIDADE DE *Quillaja brasiliensis* (A.St.-Hil. & Tul.) Mart. EM *Lactuca sativa* L. E *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. E SEU POTENCIAL COMO BIOHERBICIDA**

Maria Eduarda Matos Marques<sup>1\*</sup>, Arthur Germano Fett Neto<sup>2</sup>

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Professor do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Orientador

### **Resumo**

Bioherbicidas são uma alternativa importante ao uso dos pesticidas sintéticos no manejo de plantas invasoras. Espécies de plantas capazes de produzir compostos fitotóxicos podem representar fontes efetivas de bioherbicidas. *Quillaja brasiliensis* produz saponinas, metabólitos especializados que podem ser avaliados quanto à atividade fitotóxica. Este estudo foi conduzido para avaliar a fitotoxicidade do extrato aquoso (EA) de *Q. brasiliensis* e da fração de saponinas (QB) sobre alface e capim-arroz em ensaios de pré e pós-emergência, que avaliaram a germinação e o crescimento inicial das plântulas, respectivamente. Tanto o EA quanto a QB apresentaram alto impacto inibitório na germinação das duas plantas-alvo. Foi também observado efeito fitotóxico no crescimento pós-emergente de alface. Os resultados indicam que tanto QB quanto EA de *Q. brasiliensis* são fitotóxicos. Estudos posteriores devem detalhar o mecanismo de ação das fitotoxinas levando a um possível uso como bioherbicida.

**Autorização legal:** número da autorização legal para execução da pesquisa SISGEN A98B7B1.

**Palavras-chave:** saponinas; metabolismo especializado; sustentabilidade.

**Apoio financeiro:** CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFRGS.

### **Introdução**

Um dos grandes desafios globais é combinar o uso eficiente da terra na agricultura e a conservação da biodiversidade (Tscharntke et al., 2012). A população mundial atingirá 9,7 bilhões de pessoas em 2050 (Nações Unidas, 2019), aumentando a demanda por alimentos em nível global. Para sustentar esse nível de produção e, considerando que 20-40% da produção agrícola anual é perdida pela presença de pragas e doenças, o uso de pesticidas na agricultura aumentou significativamente nos últimos anos (FAO 2018).

São tidos como pragas os organismos invasores (animais ou plantas) ou patógenos das espécies de cultivos e florestas (Bebber et al., 2014). Plantas invasoras são a classe de pragas que mais ameaça ambientes agrícolas e naturais (Stewart, 2017). Tal fato é devido principalmente ao seu alto potencial competitivo (Zimdahl, 2018).

Os pesticidas são amplamente utilizados no Brasil e no mundo, e, apesar de combaterem pragas, podem causar impactos ambientais negativos se usados continuamente (Abbas et al., 2018). As técnicas de manejo de plantas invasoras podem variar, mas geralmente dependem de herbicidas sintéticos (Abbas et al., 2018; Chauhan e Mahajan, 2014). Dentre as práticas sustentáveis que reduzem os impactos ambientais negativos da agricultura e os custos de produção destaca-se o controle biológico (Kremer, 2019). Os bioherbicidas, que podem ser uma alternativa no manejo de plantas invasoras, são substâncias formadas por compostos naturais, sendo biodegradáveis e com baixos efeitos residuais (Cai e Gu, 2016).

Muitas espécies de plantas são capazes de produzir compostos fitotóxicos oriundos de seu metabolismo especializado, o qual é frequentemente ligado à defesa e à capacidade competitiva. Estas espécies podem representar fontes efetivas de bioherbicidas (Dayan e Duke, 2014). *Quillaja brasiliensis* produz metabólitos terpênicos foliares do tipo saponinas (Fleck et al., 2006), que podem ser avaliados quanto à atividade fitotóxica e potencial como bioherbicida. Portanto, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a atividade fitotóxica do extrato aquoso de *Q. brasiliensis* (EA) e da fração de saponinas purificadas (QB) em parâmetros morfo-fisiológicos de *Lactuca sativa* (alface) e *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz), em ensaios de pré e pós-emergência.

### **Metodologia**

As folhas de *Q. brasiliensis* foram coletadas em Canguçu, RS, Brasil. Após secas, as folhas foram trituradas, colocadas em água destilada por 8 h, filtradas, particionadas com acetato de etila e liofilizadas, produzindo o extrato aquoso (EA). O EA foi submetido à purificação por cromatografia em fase reversa e gradiente de água e metanol para obter as frações QB-80 e QB-90 (Fleck et al., 2006). Os ensaios de fitotoxicidade do extrato foram realizados com sementes e plântulas das espécies-alvo alface e capim-arroz.

Antes dos ensaios, foram feitos testes preliminares para determinar o potencial osmótico de diferentes concentrações do EA em comparação a diferentes concentrações de PEG-6000, e seu efeito sobre a germinação das duas espécies. Este experimento foi realizado utilizando o mesmo procedimento dos ensaios de germinação. O pH dos extratos foi determinado com potenciômetro.

O ensaio de pré-emergência analisou a germinação das plantas-alvo. As sementes de alface e capim-arroz foram germinadas em placas de petri com papel filtro duplo e 3 repetições por tratamento, mantidas em câmara de crescimento BOD (25° C, 12 h/12 h escuro/claro, 40  $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em cada espécie, foram aplicados os tratamentos: EAs de *Q. brasiliensis* (a 4 e 10% p/v), água destilada (controle negativo) e NaCl a 0,5 M (controle positivo). Os parâmetros analisados foram: tempo e % de germinação, comprimento da radícula e da parte aérea e índice de velocidade de germinação (Maguire, 1962). Um experimento adicional utilizou a fração purificada de saponinas (QB) com alface (mesmos parâmetros analisados); os tratamentos foram: 1 e 2% de QB e controles.

No ensaio de pós-emergência, após serem obtidas as plântulas (mantidas por 12 dias em substrato autoclavado com luz e temperatura controladas), estas foram expostas aos EAs e controles (2 mL por célula de cultivo contendo 1 planta + aspersão). Foram usadas 50 repetições por tratamento. Sete dias após aplicação, os parâmetros de crescimento inicial foram analisados: comprimento da parte aérea e da radícula, conteúdo de clorofila e massa seca das plântulas.

O ensaio de lixiviação avaliou se o extrato poderia ser lavado do solo. Com alface, os extratos foram aplicados no solo e aspergidos; após 1 dia, foram realizadas 4 aplicações de 10 mL de água destilada por célula a cada 2 dias. No dia da última aplicação, foram colocadas 2 sementes de alface por célula da sementeira (avaliando germinação e crescimento da plântula). Com capim-arroz, as plântulas já estavam no substrato por 12 dias e já haviam sofrido aplicação dos extratos. Sete dias após a aplicação, foi feita a lixiviação. Para as 2 espécies, ao final de 12 dias, os mesmos parâmetros do ensaio de pós-emergência previamente descritos foram avaliados.

GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para fazer os gráficos, e os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Tukey, quando apropriado. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## Resultados e Discussão

Soluções de até 0,02 M de PEG (osmoticamente equivalente a EA 10%) não afetaram a emergência de sementes de alface e capim-arroz. Portanto, até EA 10%, os efeitos produzidos não são osmóticos. Da mesma forma, o pH do extrato estava na faixa de 4 a 6, compatível com a germinação das espécies testadas (Sadeghloo et al., 2013; Rice, 1984).

Na pré-emergência, EA 4% e 10% inibiram a germinação nas duas plantas-alvo. Em alface, nenhuma emergência foi relatada após 5 dias, enquanto o controle negativo teve 97% de germinação. Capim-arroz teve 16% de germinação em EA 4% e 75% no controle negativo; já EA 10% inibiu toda germinação. Plantas que emergiram em EA 4% foram significativamente menores do que as do controle. Saponinas isoladas (fração QB) inibiram o comprimento radicular e da parte aérea das plântulas de alface que germinaram, e a germinação diminuiu com o aumento na concentração de QB. Os extratos também reduziram a velocidade de germinação em ambas as espécies. A inibição da germinação mesmo em baixas concentrações de extratos indica que os mesmos possuem potencial fitotóxico, em parte possivelmente devido às saponinas.

No ensaio de pós-emergência com alface, 7 dias após a aplicação dos tratamentos, as plântulas tratadas com EAs 4 e 10% apresentaram redução em relação ao controle negativo em todos os parâmetros analisados, exceto no comprimento da parte aérea e no peso seco na menor concentração (EA 4%). O teor de clorofila nas plântulas com EA 10% foi menor do que o observado no controle positivo (NaCl). As plântulas do tratamento com EA 4% apresentaram deformações, que poderiam estar relacionadas a uma concentração significativamente reduzida de clorofila. Assim, também foi observado efeito fitotóxico no crescimento pós-emergência de alface, principalmente na concentração mais alta do EA. Com capim-arroz, não foi observada diferença relevante no comprimento da radícula, comprimento da parte aérea, teor de clorofila e peso seco entre os tratamentos e se comparados aos controles. EAs não foram capazes de reduzir o crescimento inicial de capim-arroz, embora tenham inibido eficientemente sua germinação. É possível que isso reflita a já descrita maior resistência a estresses bióticos observada nas plantas invasoras (Zimdahl, 2018). No entanto, as plântulas expostas ao EA a 10% eram visivelmente mais frágeis, o que pode indicar a necessidade de uma maior concentração do extrato para essa espécie.

O substrato lixiviado de EA 10% provocou uma redução significativa do comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e massa seca de alface. Além disso, as plantas crescidas nos substratos lixiviados de extratos apresentaram redução dose dependente no teor de clorofila. Curiosamente, a taxa de germinação foi maior nos substratos lixiviados com EA 10% e 4% (56% e 51%, respectivamente), enquanto o controle negativo teve apenas 28% de emergência das plântulas. Plântulas tratadas com o EA 4% também apresentaram biomassa seca significativamente maior do que o controle, o que pode indicar um efeito nutricional dos extratos, causado, por exemplo, pela presença de açúcares nas saponinas (Magedans et al., 2019). Idealmente, um resíduo de bioherbicida na superfície do solo deve ser parcialmente lixiviável e/ou degradável, evitando a exposição das culturas subsequentes a compostos potencialmente fitotóxicos. A diminuição no efeito inibitório da germinação pós-lixiviação, combinada aos efeitos fitotóxicos do extrato sobre o crescimento das plântulas observados nos ensaios de pós-emergência, sugerem um possível uso do EA como um bioherbicida de pós-emergência com baixo teor residual no solo. Com capim-arroz também foi

observada uma diferença dos tratamentos em relação ao controle negativo; EA 4% e EA 10% tiveram um efeito dose-dependente nas plântulas em termos de comprimento da parte aérea e peso seco. Para esta espécie a exposição mais prolongada ao resíduo do extrato pode afetar negativamente as plantas.

## Conclusões

Os extratos e saponinas de *Quillaja brasiliensis* apresentaram forte atividade fitotóxica contra *Echinochloa crus-galli* e *Lactuca sativa* (com maiores níveis de dano na última), indicando significativo potencial de supressão de plantas invasoras. É necessário avaliar a possibilidade de seu uso individual ou combinado para formulações de bioherbicidas eficazes pré e pós-germinação e com efeito residual reduzido. Além disso, são necessários trabalhos futuros que visem decifrar os mecanismos de ação das fitotoxinas presentes na planta. Na maioria dos casos, como relatado para outras saponinas, a atividade desses triterpenos depende essencialmente de seus efeitos nas membranas (De Costa et al., 2011). É provável que os efeitos inibidores do crescimento observados nas plantas-teste também possam estar ligados a alterações nas propriedades e integridade de membranas celulares e organelares. O esclarecimento do mecanismo por trás da inibição de crescimento por extratos ricos em saponinas deve ser o foco de novas pesquisas. O estudo de novos bioherbicidas viáveis é um passo importante em direção à maior sustentabilidade na agricultura e na contenção e redução de danos ambientais.

## Referências bibliográficas

- Abbas, T., Zahir, Z.A., Naveed, M., Kremer, R.J., 2018. **Limitations of Existing Weed Control Practices Necessitate Development of Alternative Techniques Based on Biological Approaches**. *Advances in Agronomy*. Elsevier Inc. 147, 239-280. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.10.005>
- Bebber, D.P., Holmes, T., Gurr, S.J., 2014. **The global spread of crop pests and pathogens**. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 1398–1407. <https://doi.org/10.1111/geb.12214>
- Cai, X., Gu, M., 2016. **Bioherbicides in Organic Horticulture**. *Horticulturae*. 2, 3. <https://doi.org/10.3390/horticulturae2020003>
- Chauhan, B.S., Mahajan, G., 2014. Preface. Em: **Recent Adv. Weed Manag.** Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 5-6 (390p). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1019-9>
- Dayan, F.E., Duke, S.O., 2014. **Natural Compounds as Next-Generation Herbicides**. *Plant Physiol.* 166, 1090–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239061>
- De Costa, F., Yendo, A.C.A., Fleck, J.D., Gosmann, G., Fett-Neto, A.G., 2011. **Immunoadjuvant and anti-inflammatory plant saponins: characteristics and biotechnological approaches towards sustainable production**. *Mini Rev. Med. Chem.* 11, 857-880. doi: 10.2174/138955711796575470
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. **FAOSTAT - Pesticides Use**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>> (acessado em 25 de Maio de 2019).
- Fleck, J.D., Kauffmann, C., Spilki, F., Lencina, C.L., Roehe, P.M., Gosmann, G., 2006. **Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice**. *Vaccine*. 24, 7129–7134. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.059>
- Kremer, R.J., 2019. **Bioherbicides and nanotechnology: Current status and future trends, Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives**. Elsevier Inc. 353-366. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00015-2>
- Magedans, Y., Yendo, A.C.A., De Costa, F., Gosmann, G., Fett-Neto, A.G., 2019. **Foamy matters: an update on saponins and their use as immunoadjuvants**. *Future Medicinal Chemistry*. 11, 1485-1499. doi: 10.4155/fmc-2018-0438
- Maguire, J.D., 1962. **Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1**. *Crop science*. 2 (2), 176-177. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- Rice, E. L., 1984. **Allelopathy**. Florida: Academic Press Inc. 2, 422p.
- Sadeghloo, A., Asghari, J., Ghaderi-Far, F., 2013. **Seed germination and seedling emergence of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)**. *Planta Daninha*. 31(2), 259-266. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582013000200003>
- Stewart, C.N., 2017. **Becoming weeds**. *Nat. Genet.* 49, 654–655. <https://doi.org/10.1038/ng.3851>
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J., Whitbread, A., 2012. **Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification**. *Biol. Conserv.* 151, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- United Nations, 2019. **World Population Prospects 2019**. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>> (acessado em 4 de fevereiro de 2021).

Zimdahl, R.L., 2018. **Fundamentals of Weed Science**. Academic Press. 5, 758p.