

CONTROLE *in vitro* DE *Fusarium solani* E *Rhizoctonia* SP ATRAVÉS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Cleidinéia dos Santos Souza¹, Valdir Ribeiro Correia², Fábila Silva de Oliveira Lima³, Thávio Júnior Barbosa Pinto⁴, Wender Pereira Rodrigues⁵, Eduardo Carvalho Dias⁶

¹Estudante do Curso Superior de Engenharia Agrônoma – IFTO- *Campus* Dianópolis. Bolsista do Programa de Iniciação Científica. <e-mail: cleidysouza90@gmail.com>

²Professor– IFTO- *Campus* Dianópolis. e-mail: <valdir.correia@ifto.edu.br>

³Professor– IFTO- *Campus* Dianópolis. e-mail: <fabia.lima@ifto.edu.br>

⁴Estudante do Curso de Engenharia Agrônoma – IFTO- *Campus* Dianópolis. Bolsista do Programa de Iniciação Científica. e-mail: <thaviojunior@gmail.com>

⁵Estudante do Curso de Engenharia Agrônoma – IFTO- *Campus* Dianópolis. e-mail: <wenderpr178@gmail.com>

⁶Professor– IFTO- *Campus* Dianópolis. e-mail: <eduardo.dias@ifto.edu.br>

Resumo: Fungos fitopatogênicos estão entre os mais importantes patógenos de plantas. O controle químico é um dos mais práticos e utilizados, no entanto, seu uso em excesso e inapropriado tem trazido efeitos adversos à população humana. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de óleos essenciais extraídos de várias espécies vegetais como método alternativo de controle dos fungos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp. Culturas puras dos fungos foram cultivadas em meio batata, dextrose e ágar (BDA) contendo 0,5% dos óleos essenciais de hortelã, eucalipto, alecrim, capim-limão, citronela e cravo. Os fungos cultivados em meio BDA sem adição de óleo foram utilizados como controle. As placas contendo os fungos foram mantidas em estufa BOD a 25°C por 8 dias e seu crescimento micelial mensurado e comparado com o controle. Os óleos essenciais de hortelã, capim-limão, citronela e cravo inibiram completamente o crescimento de *F. solani*, ao passo que os óleos de alecrim e eucalipto reduziram o crescimento do fungo em 68% e 28%, respectivamente. Todos os óleos essenciais testados inibiram completamente o crescimento de *Rhizoctonia* sp. Os resultados apontam o potencial promissor dos óleos essenciais avaliados no controle alternativo desses importantes fitopatogênicos.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, fitoterápicos, fungos fitopatogênicos, manejo alternativo

1 INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos provocam perdas e prejuízos consideráveis em vários cultivos comerciais. Reduções significativas na ordem de 5 a 50% de produtividade têm sido relatadas no Brasil, afetando o custo de produção e a rentabilidade econômica no setor agrícola.

O desconhecimento por parte de técnicos e produtores a respeito dos fitopatogênicos acarreta na adoção de um manejo não apropriado que reflete diretamente nos índices de perdas, aliados às práticas de cultivo deficiente e às condições inapropriadas de armazenamento em pós-colheita (ZAMBOLIM & COSTA 2006; BRUM, 2017).

O controle baseado em defensivos agrícolas é eficiente, prático e de ação rápida, porém, o seu uso em excesso e de forma inadequada tem trazido efeitos colaterais ao ser humano e ao meio ambiente. Nesse sentido, para tentar reverter essa situação e direcionar o consumidor a buscar por alimentos com menor teor de resíduos de agrotóxicos e conhecer suas procedências, a implantação de medidas alternativas de controle, tais como resistência varietal, rotações de culturas, solarização,

produtos naturais não convencionais e controle biológico são importantes para a manutenção e aumento da produção agrícola de forma segura e sustentável (FERRAZ et al. 2010; LIMA et al. 2017). Dessa maneira, identifica-se a necessidade por avanços metodológicos em relação ao uso de métodos de controle de fitopatógenos que sejam mais alternativos e integrados. Os métodos de controle alternativos, incluindo controle biológico, cultural e produtos fitoterápicos como extratos e óleos essenciais têm sido pesquisados com êxito em alguns estudos (SILVA et al. 2010).

Embora vários trabalhos tenham sido publicados relatando o efeito de extratos e óleos essenciais de plantas no controle de fitopatógenos, pesquisas adicionais são necessárias para testes e padronização de metodologias e espécies de plantas e ou patógenos ainda não testados. Portanto, novos estudos ampliando a área de conhecimento sobre o controle de fitopatógenos, usando métodos alternativos são importantes para uma agricultura sustentável e economicamente viável.

Os óleos essenciais com potencial de controle de patógenos poderão servir de matéria prima para síntese de compostos que sejam menos danosos ao meio ambiente e ao homem. Vários trabalhos têm relatado o sucesso no controle de pragas e doenças utilizando extratos e ou óleos essenciais de várias espécies de plantas (BERNARDO et al. 2015; BRUM et al. 2017; ARAUJO et al. 2018).

Espera-se que a descoberta de um ou mais óleos essenciais com potencial de controle de fungos importantes nos sistema de produção agrícola do Brasil e região seja importante para os avanços nessa área de pesquisa. O desenvolvimento de produtos promissores poderá ser indicado na prática ou servir de base para a síntese de compostos antimicrobianos com efeitos menos danosos para o homem e a natureza.

O objetivo desse estudo foi testar o efeito *in vitro* de óleos essenciais no controle dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp.

2 METODOLOGIA

2.1 Fontes de óleos essenciais e dos fungos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp

Os óleos essenciais extraídos das plantas hortelã pimenta (*Mentha piperita*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e cravo (*Eugenia caryophyllus*) foram obtidos em farmácia de manipulação em Luís Eduardo Magalhães, Bahia.

O fungo *Fusarium solani* foi isolado de raízes de meloeiro (híbrido Tropical Amarelo) com sintomas de murcha de fusarium, ao passo que *Rhizoctonia* sp foi obtido de plântulas de quiabo (cv. Santa Cruz) com sintomas de tombamento.

Os fungos foram isolados das respectivas amostras seguindo os protocolos de isolamento de fitopatógenos, por exemplo, assepsia das amostras em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 1% (1 minuto) e lavagem em água destilada esterilizada, secagem em papel filtro esterilizado e cultivados em meio de cultura ágar-ágar (AA) sob temperatura de 25°C.

As culturas puras dos fungos foram obtidas através de repicagens sucessivas de um pequeno fragmento do micélio para novas placas contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Os fungos foram identificados a nível genérico ou de espécies de acordo com Sutton (1980) usando parâmetros morfológicos e características das colônias (relevô, pigmentação, tamanho, bordas e textura).

Para a confirmação dos fungos, foram feitos testes de patogenicidade nas respectivas hospedeiras. No teste de patogenicidade para *Rhizoctonia* sp. sementes de quiabo (cv. Santa Cruz) foram esterilizadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% e colocadas em contato com a cultura fúngica, conforme Rego (2008). As sementes do controle foram expostas ao meio BDA sem a presença do fungo e mantidas por 24 h em condições controladas (em estufa BOD, sob 25°C e 80% de umidade). Após esse período, as sementes foram semeadas em bandejas limpas contendo substrato plantimax autoclavados e mantidas em temperatura ambiente durante 10 dias até o desenvolvimento dos sintomas de tombamento.

Para a confirmação da patogenicidade de *Fusarium solani* em meloeiro, plântulas crescidas em bandejas e em substratos estéreis foram inoculadas com discos de BDA de um cm de diâmetro e analisadas para a presença dos sintomas aos 10 dias após inoculação.

2.2 Teste *in vitro* da eficiência de óleos essenciais no controle dos fungos

O experimento foi realizado no IFTO- *Campus* Dianópolis, Laboratório de Fitopatologia, de acordo com metodologias descritas por Hillen et al. (2012). Os autores desta pesquisa contribuíram igualmente com o planejamento, execução, análise e escrita dos resultados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições. Cubos de BDA de 0,5 cm contendo cultura pura do fungo foram colocados no centro de cada placa de Petri contendo meio BDA com adição de 0,5% dos óleos essenciais de cada espécie vegetal mencionada no item 2.1. Óleos essenciais foram esterilizados em membrana Milipore (0,2 mm) e adicionados ao meio BDA a temperatura de 50°C. Foi adicionado ainda Tween 20 (1%) para facilitar a dispersão do óleo no meio de cultura. Fungo cultivado em meio BDA sem adição de óleo + 1% Tween 20 serviu como controle. O fungo foi cultivado em estufa a 25°C por 8 dias e seu crescimento micelial (diâmetro da colônia) mensurado aos 4 e 8 dias após inoculação e comparados com o controle. Os dados foram submetidos à análise de normalidade, variância e teste de médias (Tukey) a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos testes de patogenicidade os fungos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp mostraram se patogênicos e desenvolveram sintomas típicos das doenças, por exemplo, murchas, necroses e tombamentos, evidenciando assim a correta identidade dos patógenos em estudo.

Os óleos essenciais de hortelã, capim-limão, citronela e cravo inibiram totalmente o crescimento do fungo *Fusarium solani* aos 4 e 8 dias após inoculação (Tabela 1, Figura 1). Ainda, os óleos essenciais de alecrim e eucalipto mostraram-se relativamente eficientes em inibir o crescimento do fungo com redução do crescimento na ordem de 54% e 28%, respectivamente, comparados com o controle (Tabela 1, Figura 1).

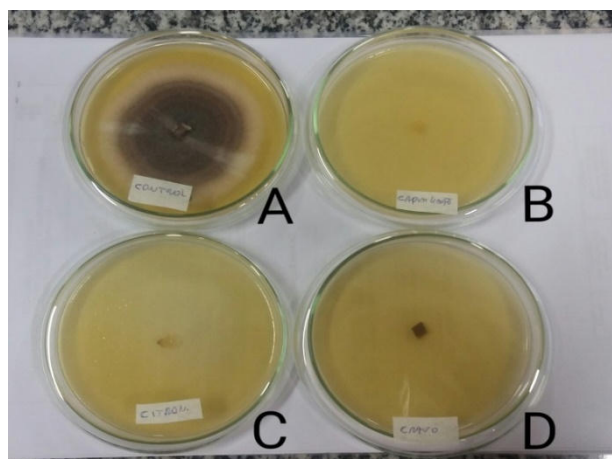
Tabela 1. Efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* de *Fusarium solani* isolado de meloeiro

Tratamentos/óleos essenciais	Crescimento micelial (diâmetro em cm) ^a			
	Dias após inoculação		Redução no crescimento (%)	
	Quatro	Oito	Quatro dias	Oito dias
Controle ^b	4,64 a	6,55 a	-	-
Hortelã	0,0 c	0,0 d	100	100
Eucalipto	2,55 b	4,7 b	45,04	28,24
Alecrim	1,09 c	3,0 c	76,50	54,20
Capim-limão	0,0 c	0,0 d	100	100
Citronela	0,0 c	0,0 d	100	100
Cravo	0,0 c	0,0 d	100	100
Teste F	45,28*	70,13*	-	-
C.V.(%) ^c	1,49	1,30	-	-

^aOs dados representam o diâmetro da colônia (cm) medidos aos 4 e 8 dias após cultivo em estufa BOD a 25°C.

^bFungo cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sem adição de óleo essencial. ^cC.V.= coeficiente de variação. *Significativo a 5%.

Figura 1. Efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* de *Fusarium solani* isolado de meloeiro. A- controle: somente meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA); B- Óleo essencial de Capim-limão. C- Citronela e D- Cravo. Os dados representam o diâmetro da colônia (cm) medidos aos 8 dias após cultivo em estufa BOD a 25°C.



Com relação à eficiência dos óleos essenciais no controle do fungo *Rhizoctonia* sp., todos os óleos testados foram 100% eficientes em inibir o crescimento *in vitro* aos 4 e 8 dias após inoculação (Tabela 2, Figura 2).

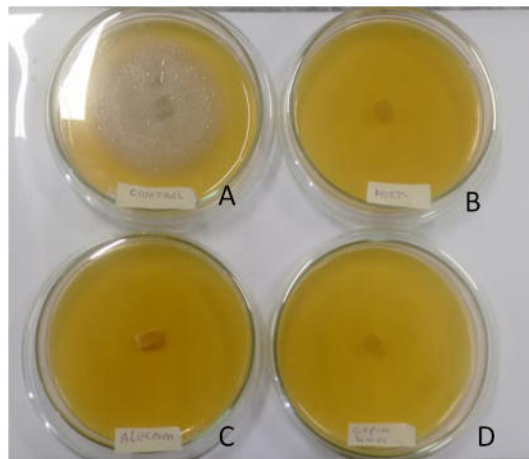
Tabela 2. Efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia* sp isolado de plântulas de quiabo.

Tratamentos/óleos essenciais	Crescimento micelial (diâmetro em cm) ^a			
	Dias após inoculação		Redução no crescimento (%)	
	Quatro	Oito	Quatro dias	Oito dias
Controle ^b	4,63* a	9,24 a	-	-
Hortelã	0,0 b	0,0 b	100	100
Eucalipto	0,0 b	0,0 b	100	100
Alecrim	0,0 b	0,0 b	100	100
Capim-limão	0,0 b	0,0 b	100	100
Citronela	0,0 b	0,0 b	100	100
Cravo	0,0 b	0,0 b	100	100
Teste F	34,86*	85,85*	-	-
C.V.(%)	2,80	1,98	-	-

^aOs dados representam o diâmetro da colônia (cm) medidos aos 4 e 8 dias após cultivo em estufa BOD a 25°C.

^bFungo cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sem adição de óleo essencial. °C.V.= coeficiente de variação. *significativo a 5%

Figura 2. Efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia* sp isolado de plântulas de quiabo. A- controle: somente meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA); B- Óleo essencial de hortelã. C- Alecrim e D- Capim-limão. Os dados representam o diâmetro da colônia (em cm) medidos aos 8 dias após cultivo em estufa BOD a 25°C.



Os resultados são similares a outros estudos que relataram o efeito antimicrobiano de extratos e óleos vegetais contra grupos específicos de fungos fitopatogênicos (HILLEN et al. 2012; ARAÚJO et al. 2018).

Os métodos de controle de fitopatógenos baseados em produtos sintéticos como fungicidas são, no geral eficientes, porém, com grande efeito colateral para o ambiente (contaminação do solo e da água) e o ser humano (intoxicações, resíduos em alimentos) (ZAMBOLIM & COSTA, 2006). A resistência genética é uma opção eficiente, barata, sem efeito colateral e que tem sido utilizada no manejo de fungos. No entanto, apresenta restrições, tais como: disponibilidade para as mais variadas culturas e regiões de cultivo, além de correlações antagônicas com alto potencial produtivo.

Em contrapartida, os métodos de controles alternativos, incluindo controle biológico, cultural e produtos fitoterápicos como extratos e óleos essenciais têm sido pesquisados com êxito em alguns estudos (SCHWAN-ESTRADA et al. 2000; DINIZ et al. 2008; ALMEIDA et al. 2009; SILVA et al. 2010; ANTUNES & CARVALHO, 2010; HILLEN et al. 2012; SOARES, 2016; ARAÚJO et al. 2018). Portanto, novos estudos ampliando a área de conhecimento sobre o controle de fitopatógenos usando métodos alternativos são importantes para uma agricultura sustentável e economicamente viável.

Os produtos naturais eram utilizados com frequência na década de 1940, no entanto, com a chegada dos agroquímicos, estes deram lugar a defensivos sintéticos amplamente utilizados pela sua praticidade (SILVA et al. 2010). Atualmente, vários produtos com princípios ativos naturais têm sido estudados com potencial no controle de doenças humanas e vegetais. Esses produtos têm a vantagem de ser seletivos contra inimigos naturais, baixa toxicidade e relativa eficiência contra patógenos (SILVA et al. 2010).

No entanto, testes adicionais são necessários para a padronização de metodologias na obtenção destes produtos e sua aplicação final (SILVA et al. 2010). Os óleos essenciais com potencial de controle de patógenos poderão servir de matéria prima para síntese de compostos que sejam menos danosos ao meio ambiente e aos humanos.

O controle químico de fitopatógenos é amplamente utilizado na agricultura devido a sua eficiência e praticidade, no entanto, devido aos riscos iminentes de contaminação a consumidores e ao ambiente, tem havido buscas por métodos alternativos de controles, com visão voltada à consciência agroecológica e sustentável.

O efeito antimicrobiano da maioria dos óleos testados nesse estudo poderá ser devido à ação de metabólitos secundários específicos. Como constituintes podemos citar o 1,8 cineol 'eucaliptol', cânfora, verbenona, alfa pineno (alecrim), eugenol, iso-eugenol (cravo), cineol (eucalipto), mentol, trans-2- hexanal (hortelã), citral, eugenol, fornesol, metileugenol (citronela, capim-limão) (WOLFFENBUTTER, 2011).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais testados nesse estudo mostraram se promissores no controle dos fungos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp. A descoberta de um ou mais óleos essenciais com potencial de controle de fungos fitopatogênicos é importante para os sistemas de produção agrícola no Brasil e região, com aplicação prática no manejo desses patógenos, além da possibilidade de síntese de algum subproduto com menor efeito danoso ao ambiente e ao homem. O desenvolvimento de produtos promissores poderá ser indicado na prática ou servir de base para síntese de compostos antimicrobianos.

Uma das aplicações práticas no controle de fungos fitopatogênicos poderia ser em pulverizações de frutos e hortaliças em pós-colheita, pois além de sua comprovada eficiência em inibir o crescimento dos fungos, são produtos naturais, biodegradáveis diminuindo assim os impactos da utilização de produtos sintéticos com efeitos adversos ao consumidor. No entanto, estudos considerando a concentração desses óleos, assim como possíveis fitotoxidez às plantas devem ser considerados.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Federal do Tocantins pela disponibilização das bolsas de estudos.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C. **Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro.** Summa Phytopathologica 35: 196-201, 2009.

ANTUNES, M.D.C.; CARVALHO, A. **The use of essential oils for postharvest decay control. A review.** Flavour Fragrance Journal 25: 351-366, 2010.

ARAUJO, A.C.; TOLEDO, E.D.; SOARES, W.R.O. **Produtos alternativos no controle de *Colletotrichum* spp. isolados de manga e banana.** Cientific@ Multidisciplinary Journal 5: 104-122, 2018.

BERNARDO, R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R.; STANGARLIN, J. R. et al. **Atividade fungitóxica *in vitro* de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.** Scientia Agraria Paranaensis 14: 89-93, 2015.

BRUM, R.B.C.S.; DE CASTRO, H.G.; CARDON, C.H. et al. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos.** Magistra 26: 361-371, 2017.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. et al. 2010. **Manejo sustentável de fitonematoides.** Viçosa: UFV, 306 p.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Mesquini, R.M.; Cruz, M.E.S.; Stangarlin, J.R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais 14: 439-445, 2012.

LIMA, F.S.O.; CORREA, V.R.; NOGUEIRA S.R. et al. 2017. **Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management.** InTechOpen DOI:10.5772/67030.

REGO, S.S. Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* e *Myrceugenia gertii* Landrum- Myrtaceae. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos.** Revista Floresta 30: 129-137, 2000.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; JUNIOR, T. J. P.; VENZON, M.; FONSECA, M.C.M. **Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas.** In VENZON, M.; JUNIOR, T.J.P.; PALLINI, A. (Eds.). Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Epamig, pp. 33-53, 2010.

SUTTON, BC. **The Coelomycetos.** Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, KEW, 696 p, 1980.

WOLFFENBUTTER, A.N. **Base da química dos óleos essenciais e aromoterapia- abordagem técnica e científica.** São Paulo: Roca, 167p. 2011.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. **Manejo integrado de doenças do morangueiro.** In CARVALHO, S.P. (Ed). Boletim do morango: Cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte- FAEMG: 55-80p, 2006.