

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
ELISA COSER

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO**  
*Sclerotium rolfsii* **IN VITRO** E EM PLANTAS DE TOMATE

Curitibanos

2018

**ELISA COSER**

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO *Sclerotium*  
*rolfsii* *IN VITRO* E EM PLANTAS DE TOMATE**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Terumi Itako

Curitibanos

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coser, Elisa

Potencial de óleos essenciais no controle do fungo  
*Sclerotium rolfsii* in vitro e em plantas de tomate / Elisa  
Coser ; orientadora, Adriana Terumi Itako, 2018.  
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2018.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Controle Alternativo. 3. *Cymbopogon  
citratus*. 4. *Mentha arvensis*. 5. *Syzygium aromaticum*. I.  
Itako, Adriana Terumi. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.

Elisa Coser

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO *Sclerotium rolfsii* IN VITRO E EM PLANTAS DE TOMATE**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus de Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

**Orientadora: Adriana Terumi Itako**

Data da defesa: 05/06/2018

**MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:**

*Adriana Terumi Itako*

---

**Presidente e Orientador: Adriana Terumi Itako**

**Titulação: Doutora**

**Área de concentração em Fitopatologia**

**Universidade Federal de Santa Catarina**

*[Assinatura]*

---

**Membro Titular: Lírio Luiz Dal Vesco**

**Titulação Doutor**

**Área de concentração em Biotecnologia Vegetal**

**Universidade Federal de Santa Catarina**

*Medrado*

---

**Membro Titular: Pedro Henrique da Silva Medrado**

**Titulação Graduação em Biologia**

**Universidade Federal de Santa Catarina**

**Local: Universidade Federal de Santa Catarina**

**Campus de Curitibanos**

**Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia**

*Dedico esse trabalho à minha família, ao meu marido, aos meus professores e aos meus amigos, pelos ensinamentos, apoio, carinho e compreensão. Às pessoas queridas com quem convivi nesses anos e compartilhei sentimentos, sonhos e momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a cada pessoa que passou pela minha vida durante este período de graduação, pois cada uma delas teve sua importância para minha formação e também vida pessoal. Entretanto, aqueles que sempre estiveram ao meu lado e foram essenciais para realização deste sonho, cito aqui:

- Minha família que foram meus grandes influenciadores e educadores, especialmente, minha mãe Salette Rampon, meus irmãos Juliana Coser e Paulo R. Coser, meus cunhados Maurício Guindani e Juliane Oneda e meus sobrinhos Izabelly e Luiz Otávio. Agradeço pelo exemplo, carinho, conversas, apoio e felicidade compartilhados.

- Meu marido, meu companheiro Claiton Bohnenbenger por acreditar no meu potencial, pelo incentivo, carinho, apoio e compreensão, por tudo que dedicou e fez por mim nesse período. Agradeço pela nossa harmoniosa convivência, cumplicidade e pela sua grande ajuda em enfrentar as adversidades que encontrei nesse caminho.

- Meus Professores do Curso de Agronomia da Universidade que foram as minhas grandes fontes de conhecimento e também grandes exemplos, em especial minha professora orientadora Adriana Terumi Itako e os professores João Batista Tolentino Jr e Elis Borcioni. Agradeço pela partilha de conhecimento, dedicação, conselhos, paciência e pela prontidão em responder minhas dúvidas e me auxiliar.

- Todos os meus colegas e amigos da Universidade, em especial ao André Luiz Graf Jr e demais colegas de pesquisa, pelo auxílio nos experimentos e momentos vividos em laboratório, também à Andriele C. Moraes, Dalila Furlan, Paola Ribeiro e Pamela Ribeiro que desde o início estiveram compartilhando momentos e conhecimento. Agradeço por serem minha segunda família.

- A Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos e toda sua equipe de técnicos e funcionários. Agradeço pela atenção e prontidão em me auxiliar sempre que necessitei.

**A todos vocês minha INFINITA GRATIDÃO!**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

*Sclerotium rolfsii* é um fungo fitopatogênico responsável por causar podridão da raiz e do colo, murcha e tombamento de plântulas, atacando diversas famílias botânicas. Quando em condições desfavoráveis para o crescimento micelial, pode sobreviver no solo, por mais de cinco anos sob a forma de escleródio, sendo um fungo de difícil controle por apresentar essa estrutura de resistência. As substâncias produzidas por algumas plantas atuam como agentes fungistáticos ou fungicidas e vem sendo uma alternativa segura, viável e eficiente no controle de fungos fitopatogênicos. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial de controle *in vitro* e *in vivo* do fungo *S. rolfsii* com o uso de diferentes tipos e doses de óleos essenciais. Para avaliação da inibição da germinação dos escleródios *in vitro* foram utilizados óleos essenciais de capim limão (*Cymbopogon citratus*) e cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) nas doses de 1000, 2000, 3000 e 5000ppm, tendo como controle o fungicida químico fluazinam (Cignus®) a uma concentração de 1%. A metodologia de avaliação consistiu em realizar a contagem do número de escleródios germinados (presença de hifas) e não germinados (ausência de hifas) no período de 40 dias. Posteriormente, para avaliar a viabilidade, os escleródios não germinados foram submetidos ao teste de Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT). *In vivo*, em contato com plantas de tomate foram utilizados os óleos essenciais de cravo da Índia, capim limão e hortelã (*Mentha arvensis*) na dose de 5000ppm e o fungicida na concentração de 1%. Em laboratório, os óleos essenciais de cravo nas doses de 3000 e 5000ppm e de capim limão na dose de 5000ppm mostraram-se eficientes na inibição da germinação dos escleródios no período avaliado. As maiores doses de cravo também apresentaram os melhores resultados quanto à inativação dos escleródios. Já nas avaliações em casa de vegetação os tratamentos com óleos essenciais não apresentaram eficiência no controle do fungo, apenas o fungicida fluazinam obteve êxito no controle.

Palavras-chave: Controle Alternativo. *Cymbopogon citratus*. *Mentha arvensis*. *Syzygium aromaticum*.

## ABSTRACT

*Sclerotium rolfsii* is a phytopathogenic fungus responsible for causing root and colon rot, wilt and seedling deposition, attacking various botanical families. When under unfavorable conditions for mycelial growth, it can survive in soil for more than five years in the form of sclerotium, being a fungus difficult to control because it has this resistance structure. The substances produced by some plants act as fungistatic or fungicidal agents and have been a safe, viable and efficient alternative in the control of phytopathogenic fungi. Thus, the present work aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* control potential of the *S. rolfsii* fungus with the use of different types and doses of essential oils. In order to evaluate the inhibition of sclerotia germination *in vitro*, essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* were used at 1000, 2000, 3000 and 5000 ppm doses, using the chemical fungicide fluazinam (Cignus®) at a concentration of 1%. The evaluation methodology consisted in counting the number of germinated sclerotia (presence of hyphae) and non-sprouting (absence of hyphae) during the 40 day period. Subsequently, to assess viability, the non-germinated sclerotia were submitted to the Triphenyl Tetrazolium Chloride (TCT) test. *In vivo*, tomato *C. citratus*, *S. aromaticum* and *Mentha arvensis* at 5000 ppm and fungicide at 1% concentration were used in contact with tomato plants. In the laboratory, *S. aromaticum* essential oils at doses of 3000 and 5000 ppm and *C. citratus* at 5000 ppm were effective in inhibiting sclerotia germination in the evaluated period. The highest doses of *S. aromaticum* also had the best results regarding the inactivation of sclerotia. In the greenhouse evaluations, the treatments with essential oils did not show efficiency in fungus control, only the fungicide fluazinam was successful in the control.

**Keywords:** Alternative Control. *Cymbopogon citratus*. *Mentha arvensis*. *Syzygium aromaticum*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Crescimento micelial do fungo e escleródios sobre arroz autoclavado após incubação durante 5 dias (A). Divisão da placa em 8 partes (B), distribuição de 1/8 de inóculo em cada vaso (C) e sua incorporação leve no solo (D). .....26
- Figura 2.** Esquematização dos períodos entre as atividades de inoculação, tratamentos e avaliações visuais do experimento da germinação *in vivo*. .....27
- Figura 3.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a porcentagem de inibição da germinação dos escleródios do fungo *S. rolfsii* tratados com os óleos essenciais de cravo da índia e capim limão nas doses de 1000, 2000, 3000 e 5000 ppm, fungicida fluazinam e testemunha (H<sub>2</sub>O). .....29
- Figura 4.** Alguns resultados do teste TCT. Escleródios submetidos ao tratamento com óleo de Cravo-5000ppm (A) e Cravo-3000ppm (B); fungicida fluazinam – 1% (C); e testemunha (H<sub>2</sub>O) (D). Escleródios inviáveis em A e B, e escleródios ainda viáveis em C e D.....30
- Figura 5.** Alguns resultados da avaliação da germinação *in vivo*. Micélio ao redor do colo causando tombamento da planta tratada com H<sub>2</sub>O (testemunha) (A). Ausência de sintomas em plantas tratadas com fungicida fluazinam (B). Sintomas de fitotoxicidade em planta tratada com óleo de cravo da índia na dose de 5000 ppm (C). Micélio causando constrição do colo de planta tratada com óleo de capim limão na dose de 5000ppm (D). Presença de micélio no colo da planta tratada com óleo de hortelã na dose de 5000ppm (E). ..... 32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de viabilidade de escleródios do fungo <i>S. rolfsii</i> pelo teste TCT sob tratamento com óleos essenciais de cravo da índia e capim limão nas doses 1000, 2000, 3000 e 5000 ppm, fungicida fluazinam (Fung.) à 1% e testemunha (H <sub>2</sub> O) (Test.).....	29
<b>Tabela 2.</b> Resultados das avaliações visuais obtidas após os tratamentos com os óleos essenciais de cravo da índia, capim limão e hortelã na dose de 5000ppm; fungicida fluazinam na concentração de 1% e testemunha (H <sub>2</sub> O). .....	31

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BDA - Batata-Dextrose-Ágar

AA – Ágar-Água

BOD - Incubadora com Controle de Temperatura e Fotoperíodo

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

TCT – Teste Trifenil Cloreto de Tetrazólio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>16</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1	A CULTURA DO TOMATEIRO .....	17
2.2	CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	18
2.3	FORMAS DE CONTROLE DA PODRIDÃO DO ESCLERÓDIO.....	18
2.4	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS FITOPATOGÊNICAS .....	19
<b>2.4.1</b>	<b>Utilização de Óleos Essenciais de Capim Limão, Cravo da Índia e Hortelã .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	OBTENÇÃO DOS ESCLERÓDIOS E ÓLEOS ESSENCIAIS .....	23
3.2	AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO E VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	23
<b>3.2.1</b>	<b>Teste Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT) .....</b>	<b>24</b>
3.3	AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA DOENÇA <i>IN VIVO</i> .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
4.1	AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO E VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	28
4.2	AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA DOENÇA <i>IN VIVO</i> .....	31
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*Sclerotium rolfsii* é um fungo fitopatogênico responsável por causar a doença chamada popularmente de podridão do escleródio ou murcha do escleródio (AGRIOS, 2005; AMORIM et al., 2016). Esse patógeno possui uma vasta gama de plantas hospedeiras, cerca 100 famílias botânicas e mais de 500 espécies (SERRA; SILVA, 2005). O cultivo do tomateiro no país é bastante prejudicado, pois a planta é altamente suscetível ao ataque desse agente fitopatogênico (KIMATI et al., 2005; PAULA et al., 2014).

As condições climáticas ideais para o crescimento micelial desse fungo são alta umidade e temperaturas entre 20°C e 30°C (PUNJA; RAHE, 1992). Porém, em condições desfavoráveis, pode sobreviver no solo, por mais de cinco anos, sob a forma de escleródio. Desta maneira, o *S. rolfsii* se torna um fungo de difícil controle por apresentar essa estrutura de resistência, sendo necessárias aplicações sequenciais de fungicida para inibir a sua germinação ou/e causar a morte dos escleródios (ACHIEME et al., 2009).

Com o intuito de reduzir a utilização excessiva de fungicidas sintéticos, o uso de óleos essenciais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares vem sendo uma alternativa segura, viável e eficiente no controle de fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2009), devido as substâncias produzidas por algumas delas atuarem como agentes fungistáticos ou fungicidas (ANTUNES; CAVACOB, 2010). Dentre essas plantas, destacam-se capim limão (*Cymbopogon citratus*), cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) e hortelã (*Mentha arvensis*), que vem sendo amplamente estudadas no controle alternativo de doenças em plantas de importância agrícola.

Muitos benefícios são alcançados com a utilização desse controle alternativo, entre eles, os principais se referem à diminuição das perdas de produtividade e à redução dos custos de produção. Há de se levar em consideração ainda, que a busca por alternativas viáveis que contribuam com o setor agropecuário são necessárias, frente à demanda crescente por alimentos mais saudáveis (ANDRADE; NUNES, 2001). Nesse contexto, o uso de compostos oriundos de plantas medicinais e aromáticas, como extratos e óleos essenciais ganham destaque, pois além de possuírem ação antifúngica, as substâncias que compõem essas plantas não trazem riscos ao ambiente e ao homem quando comparados aos fungicidas sintéticos

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de controle *in vitro* e *in vivo* do fungo *S. rolfsii* com o uso de diferentes tipos e doses de óleos essenciais.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, em condições laboratoriais, o potencial de inibição da germinação dos escleródios de *S. rolfsii* através do tratamento com óleos essenciais de capim limão e cravo da índia, em diferentes doses;
- Observar o potencial dos óleos essenciais de capim limão e cravo da índia, nas diferentes doses, em inativar os escleródios do fungo *S. rolfsii* através do teste TCT;
- Avaliar, em casa de vegetação com a presença de plantas de tomate, o potencial de controle da incidência da doença causada pelo *S. rolfsii* através dos tratamentos com óleos essenciais de cravo da índia, capim limão e hortelã.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A CULTURA DO TOMATEIRO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta anual, herbácea e possui cultivares com hábito crescimento determinado e indeterminado, sendo que quando indeterminado, pode atingir mais de dois metros de altura. A espécie pertence à família Solanaceae que também inclui culturas como, a batata, o tabaco, o pimentão e a berinjela, entre outras (NAIKA et al., 2006).

A espécie é originária da região andina da América do Sul, entretanto, a sua domesticação ocorreu no México e posteriormente foi introduzida na Europa em 1544, disseminando-se para a Ásia, África e Oriente Médio (REBELO et al., 2000). Pelo conhecimento atrelado as suas origens, o tomateiro tem seu desenvolvimento em condições de clima tropical de altitude e subtropical, fresco e seco, com bastante luminosidade, porém, é bastante tolerante as variações dos fatores climáticos (NAIKA et al., 2006).

No mundo, o tomate tornou-se um dos frutos mais importantes, pois segundo Naika (2006) em 2001, a produção mundial de tomate atingiu aproximadamente, 105 milhões de toneladas, sendo produzido em uma área estimada de 3,9 milhões de hectares. No Brasil, o tomate é considerado o segundo fruto mais importante entre as hortaliças, sendo os maiores estados produtores São Paulo, Goiás, e Minas Gerais. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2014), neste mesmo ano no país foram produzidos um total de 3.965.915 de toneladas de tomate. Em Santa Catarina, a maior produção concentra-se nas cidades de Caçador, Lages, Joaçaba e Joinville (MUELLER et al., 2008). A produção do Estado corresponde a 4,3% da produção nacional, sendo colhidas cerca de 170 mil toneladas na safra de janeiro/2014 (IBGE, 2014).

O cultivo do tomateiro no país é bastante prejudicado em função da alta sensibilidade da planta ao surgimento de patógenos, principalmente fungos e bactérias, devido à umidade e temperatura elevadas. Uma das principais doenças presentes nesse cultivo é a murcha ou podridão do escleródio causada pelo fungo *S. rolfsii*, que ocorre sob condições de alta umidade relativa e temperatura entre 20-30°C (KUROZAWA; PAVAN, 2005; AMORIM et al., 2016).

Os sintomas da doença causada pelo *S. rolfsii* são caracterizados pelo murchamento das plantas em consequência da necrose na região do colo. Assim, próximo a esse tecido

doente, observa-se o crescimento micelial branco que, posteriormente, pode formar as estruturas de resistência. O micélio pode se desenvolver também em frutos quando em contato com o solo contaminado (KUROZAWA; PAVAN, 2005; AMORIM et al., 2016).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO *Sclerotium rolfsii*

A espécie *S. rolfsii* pertence ao filo Ascomycota, apresenta fase de desenvolvimento assexual, onde não há produção de esporos, somente formação de escleródios (AGRIOS, 2005). O crescimento micelial é caracterizado pela aglomeração de hifas, sendo as mesmas septadas, hialinas e bastante ramificadas. O fungo ainda forma estruturas de resistência chamadas de escleródios, que geralmente possuem coloração marrom escura a preta e o tamanho varia de 0,5mm a 2,0mm de diâmetro, por isso, também podem ser denominadas de microescleródios (PUNJA; RAHE, 1992).

Esse fitopatógeno possui uma vasta gama de plantas hospedeiras, cerca de 500 espécies vegetais pertencentes a aproximadamente 100 famílias botânicas. A alface, o alho, a cebola, a batata, a cenoura, o feijão, a soja e o tomate são algumas das hospedeiras do fungo (SERRA; SILVA, 2005). Achieme et al. (2009) descreve que o ataque do fungo é caracterizado por causar murchamento, seguido de tombamento de plântulas e por fim podridões de raízes, colo, bulbos e frutos.

As condições climáticas ideais para o crescimento micelial desse fungo são alta umidade e temperaturas entre 25°C e 35°C (KIMATI et al., 2005). Porém, quando não encontra condições favoráveis, pode sobreviver no solo, por mais de cinco anos, sob a forma de escleródio (ACHIEME et al., 2009). Desta maneira, o *S. rolfsii* torna-se um fungo de difícil controle por apresentar essa estrutura de resistência, sendo necessárias aplicações sequenciais de fungicida para inibir a sua germinação ou/e causar a morte dos escleródios.

## 2.3 FORMAS DE CONTROLE DA PODRIDÃO DO ESCLERÓDIO

O controle do *S. rolfsii* é extremamente difícil devido as suas características, principalmente pelo elevado número de hospedeiros, agressividade de infecção e a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo através da sua estrutura de resistência (VALLE; AGUILAR, 2004; MAUDE, 2006). Assim, deve-se optar pelo manejo integrado dessa doença para que haja eficiência no controle.

O controle começa através de métodos preventivos, como cita Kimati et al. (2005) deve-se evitar a entrada do fungo em áreas isentas, por isso recomenda-se o uso de sementes certificadas, utilização de equipamentos higienizados e fontes de água de procedência reconhecida. A rotação de cultura, aração do solo (GARREN, 1961 apud MARTINS et al., 2010) e plantio direto (BARBOSA; GONZAGA, 2012) são práticas que visam diminuir a incidência da doença. Ainda, o uso de controle biológico tem sido bastante evidenciado atualmente, alguns produtos à base de bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* e do fungo *Trichoderma* (MARTINS et al., 2010) estão sendo amplamente estudados para fins de controle de doenças fúngicas.

Outra alternativa é a prática da solarização em áreas pequenas e também na produção de mudas livres de escleródios do fungo. Martins et al. (2003) em seu experimento, utilizaram diferentes coletores solares que chegaram a aquecer o substrato até 45°C no período entre 8h e 16h, mostrando que essa temperatura foi eficiente na erradicação dos escleródios do *S. rolf sii*. Nesse mesmo experimento, para comprovar a inativação desses escleródios utilizou-se o Teste de Trifenil Cloreto de Tetrazólio, assim foi possível visualizar através da diferença de coloração interna dos mesmos, se havia ou não atividade respiratória.

O controle convencional do *S. rolf sii* em diversas culturas é realizado com o uso de produtos fitossanitários e é o mais utilizado, pois confere resultados imediatistas, porém, não completamente eficientes. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2017) para o controle da podridão do escleródio tem-se recomendação de produtos à base de tiofanato-metílico para cultura do feijão de vagem, quintozeno e carboxina para cultura do amendoim, carboxina para a cultura da soja e fluazinam para cultura do feijão caupi. Para o controle da doença na cultura do tomateiro não há produtos registrados no MAPA, entretanto, a fins de pesquisa, comumente utiliza-se produtos à base de quintozeno (PELZER, 2010) e fluazinam (SANTOS, 2016), fungicidas utilizados no controle de podridões radiculares e doenças similares à murcha do escleródio.

## 2.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS FITOPATOGÊNICAS

O uso desenfreado de produtos químicos associado à forma de aplicação inadequada está sendo um dos maiores problemas na área agrícola atualmente. Essa questão compromete não só a saúde do produtor rural, mas também a do consumidor, além de provocar danos ao ecossistema (MOREIRA et al., 2002). Assim, vem sendo estudadas formas alternativas de

controle de doenças, a fim de diminuir a utilização de agroquímicos que possam prejudicar a saúde, meio ambiente e também interferir em um maior custo de produção (STADNIK; TALAMINI, 2004).

A utilização de plantas medicinais, condimentares e aromáticas no controle de fitopatógenos tem sido estudada como uma dessas alternativas, já que as substâncias ativas que realizam o controle efetivamente são naturais e produzidas a partir do metabolismo secundário da própria planta. Segundo Venturoso, Bacchi e Gavassoni (2011), as substâncias são metabólitos secundários produzidos naturalmente pela planta como um mecanismo de defesa contra patógenos. Os metabólitos secundários são separados em diferentes grupos químicos, os mais conhecidos são os terpenos, flavonóides e alcalóides (MORAIS; GONÇALVES; BETTIOL, 2009).

Bakkali et al. (2008) avaliou as características lipofílicas dos óleos essenciais, que as conferiu propriedades antibióticas. A hidrofobicidade do óleo essencial proporciona uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular dos microrganismos, prejudicando a permeabilidade e causando alterações na sua estrutura, expressando graves danos quando expostos a concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais. Como demonstrado nos trabalhos de Costa et al. (2011) e Rasooli et al. (2006) onde o micélio dos patógenos avaliados contiveram alteração morfológica nas hifas, interrupção e destruição das membranas plasmáticas e mitocondriais.

Desta maneira, o uso de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares é considerado uma alternativa segura, viável e eficiente no controle de fungos (SILVA et al., 2009). As substâncias produzidas por algumas dessas plantas atuam como agentes fungistáticos ou fungicidas, dependendo das concentrações utilizadas, sendo um mesmo óleo utilizado contra uma grande gama de espécies microbianas (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

Atualmente, inúmeros trabalhos são realizados a fim de encontrar óleos essenciais que consigam inibir o crescimento de fungos e inativar suas estruturas de resistência, como os escleródios. A princípio os trabalhos se resumem em estudos *in vitro* sobre o comportamento dos fungos em resposta a presença desses óleos essenciais em meio de cultura e, posteriormente, as metodologias são readequadas para aplicação à campo e em contato com as culturas (SOUSA; SERRA; MELO, 2012).

Faria et al. (2006) identificaram resultados positivos do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum gratissimum*) sobre o crescimento de *Penicillium chrysogenum* e *Alternaria* spp. isolados de cenoura e tomate. Outro trabalho, verificou em plantas de arroz, a inibição do

crescimento micelial de *Alternaria* sp., *Bipolaris oryzae*, *Curvularia* sp., *Gerlacltia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* pelo óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (ZANANDREA et al, 2004).

Salgado et al. (2003) estudaram a ação dos óleos essenciais de espécies de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. uroplylla*) nas concentrações de 5, 50 e 500mg/kg sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *B. sorokiniana*, obtendo 100% de inibição na maior concentração utilizada. Também Chiamaka et al. (2016) realizaram um experimento testando a ação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* sp. e comprovaram inibição desse crescimento em 95% utilizando *R. officinalis* e 100% utilizando *E. globulus*.

#### **2.4.1 Utilização de Óleos Essenciais de Capim Limão, Cravo da Índia e Hortelã**

O potencial de controle de fungos é atribuído às substâncias constituintes (princípios ativos) dos óleos essenciais que estão dentro do grupo químico dos terpenos (MORAIS; GONÇALVES; BETTIOL, 2009). O óleo de cravo da índia (*S. aromaticum*) é composto em sua maioria pela substância chamada de eugenol que possui propriedades antifúngicas e é extremamente concentrado e hidrofóbico (VENTUROSO; BACCHI; GAVASSONI, 2011). Nos óleos de capim limão (*C. citratus*) e hortelã (*M. arvensis*) as principais substâncias presentes, que possuem potencial fungistático e fungicida, são o citral e o mentol, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2003). Ainda, recomenda-se a nível experimental, que se realize a coleta dessas plantas preferencialmente no período da manhã, por volta das 7:00h, pois é nesse momento do dia que se concentram maiores quantidades dos princípios ativos, resultando na maior quantidade de óleo essencial extraído.

Esses óleos possuem resultados bastante positivos no controle de diferentes fungos. Como mostra o estudo de Rozwalka et al. (2008) na cultura da goiaba, em que verificaram o potencial do óleo essencial de cravo da índia sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, observando 100% de inibição nos dois casos. O mesmo trabalho testou o óleo de capim limão e comprovou total inibição do crescimento micelial para *C. gloeosporioides*.

Marques et al. (2003) verificaram que o citral presente em *C. citratus* foram eficientes na inibição *in vitro* e *in vivo* do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* causador da

antracnose do mamão. Outro trabalho utilizando óleo essencial de *C. citratus*, em doses crescentes, verificou a inibição do desenvolvimento de *Alternaria solani* em plantas de tomate (ITAKO et al., 2013). No experimento de Costa et al. (2011) utilizando óleo essencial de cravo da índia no controle de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *Macrophomina phaseolina*, observaram-se 100% de inibição do crescimento micelial, exceto para *M. phaseolina*. *Encontrar controle biológico para scler rolfsii*

Silva, Oliveira e Diniz (2012) utilizaram o óleo essencial de *M. arvensis* em experimentos *in vitro* e observaram que na concentração de 100 µL, todos os fungos testados sofreram ação fungicida do óleo, que atuou na inibição do crescimento micelial de *Aspergillus* sp. em 95%, *Penicillium rubrum* em 90%, *Sclerotinia* sp. em 100%, *Fusarium verticillioides* em 80% e *Corynespora cassicola* em 93%. No trabalho *in vitro* de Peixinho, Ribeiro e Amorin (2017) o óleo de *M. arvensis* foi capaz de inibir em 100% o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e o experimento *in vivo* na casa de vegetação, ambos situados na Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos localizada na Rodovia Municipal Ulisses Gaboardi, km 3, sendo as coordenadas geográficas 27°17'03" de latitude Sul e 50°32'13" longitude Oeste, e uma altitude de 1088 m (GOOGLE EARTH, 2014).

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ESCLERÓDIOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

O fungo *S. rolfsii* foi isolado de plantas de tomate que continham os sintomas característicos da doença, sendo essas plantas obtidas de propriedades da região de Curitibanos-SC. Assim, os escleródios coletados foram desinfetados durante 1 min. em álcool a 70%, 1 min. em hipoclorito de sódio a 2% e então enxaguados em água destilada (PUNJA; RAHE, 1992). Após o procedimento de desinfecção, os escleródios foram colocados em placas de Petri (150x15mm) contendo 20 ml de meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados em fotoperíodo de 12 horas a 25°C. Esse procedimento permitiu o desenvolvimento do micélio que, posteriormente, deu origem a uma maior quantidade de escleródios para realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Em estudo preliminar, avaliando o controle do crescimento micelial de *S. rolfsii* utilizando os óleos essenciais de capim limão, cravo da Índia, alecrim, eucalipto, gengibre e hortelã observou-se melhores resultados em relação aos óleos de capim limão, cravo da Índia e hortelã. Em função desses resultados, os óleos essenciais citados foram escolhidos no presente estudo. Os mesmos foram adquiridos comercialmente da empresa marca By Samia®.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO E VIABILIDADE *IN VITRO*

O experimento *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) utilizando dez (10) tratamentos, formados pela junção de dois (2) óleos essenciais, sendo quatro (4) diferentes doses de cada óleo + duas (2) testemunhas (água e fungicida) e utilizando quatro (4) repetições, totalizando quarenta (40) unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri (150x15mm) com 12 escleródios, totalizando 480 escleródios utilizados.

Para avaliação da inibição da germinação dos escleródios, os óleos essenciais de cravo e capim limão foram testados em diferentes doses, sendo elas: 1000, 2000, 3000 e 5000ppm. As soluções com óleos essenciais foram formadas pela adição de água na quantidade correspondente à dose, 500mg/L de antibiótico (Estreptomicina e Penicillina) e Tween20® a 0,5%. Esse experimento foi composto por duas testemunhas, uma delas utilizando um fungicida com princípio ativo fluazinam, comercialmente denominado Cignus®, sendo o mesmo, adicionado a uma concentração de 1%, e como um segundo controle também se fez a utilização de apenas água destilada (H<sub>2</sub>O).

Para iniciar o experimento, foram vertidos 20ml de meio de cultura AA (Ágar-Água) em placas de Petri (150x15mm). Após a solidificação do meio, foram adicionados 4ml das soluções dos óleos essenciais nas doses crescentes e do fungicida. Assim, 12 escleródios foram colocados de forma equidistante, com auxílio de pinças, sobre a superfície do meio de cultura e em contato com as soluções. Anteriormente, os escleródios passaram por processo de desinfecção (álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 2%). Por fim, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar.

A avaliação da germinação dos escleródios foi iniciada 24 horas após a instalação do experimento e perdurou por 40 dias, sendo realizada diariamente. Nessa avaliação, com auxílio de um microscópio estereoscópio, foi feita a contagem do número de escleródios germinados, através da visualização da presença de hifas ao redor do escleródio e sobre o meio de cultura; e também contagem de escleródios não germinados, ou seja, quando na ausência de hifas.

Os dados obtidos do experimento *in vitro* foram submetidos à análise de sobrevivência por meio do cálculo das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando a função *survfit* do pacote *survival* do software estatístico R.

### **3.2.1 Teste Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT)**

Para avaliar a viabilidade dos escleródios após o período de 40 dias e ao serem submetidos aos tratamentos, foi realizado também o teste de Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT). Seguindo a metodologia de Martins et al. (2003), os escleródios não germinados foram imersos em 2ml de solução de TCT a 0,5% com pH de 6,3 a 6,5, e posteriormente, acondicionados em vidros âmbar por 24 horas a 30°C. Após o período, os mesmos foram retirados da solução TCT, lavados em água destilada, secos em papel-toalha e cortados ao

meio para visualização da coloração interna. Quando a coloração se apresenta rosada ou avermelhada indica que o escleródio está viável e a ausência de coloração interna demonstra a inviabilidade da estrutura. Quanto aos resultados obtidos a partir da visualização da coloração dos escleródios no teste de TCT, foi realizada uma análise descritiva.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA DOENÇA *IN VIVO*

O experimento em casa de vegetação também foi conduzido em DIC utilizando cinco (5) tratamentos, formados pela junção de três (3) óleos essenciais, sendo uma (1) dose de cada óleo + duas (2) testemunhas (água e fungicida) e utilizando oito (8) repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso de 1L contendo uma planta, totalizando 40 vasos.

Para avaliação da incidência da doença, os óleos essenciais de cravo, capim limão e hortelã foram testados em apenas uma dose, 5000 ppm. O experimento *in vivo* também foi composto por duas testemunhas, uma delas utilizando um fungicida com princípio ativo fluazinam, sendo o mesmo, adicionado seguindo a recomendação comercial, e como um segundo controle também se fez a utilização de apenas água destilada (H<sub>2</sub>O).

Para obtenção das mudas de tomate, foi realizada a semeadura de tomate cereja comum em bandejas de isopor. Assim, 20 dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos de 1L com substrato industrializado a base de casca de pinus da marca Macplant® e terra peneirada na proporção 2:1. A inoculação com o fungo foi realizada após 10 dias do transplante das mudas.

Seguindo metodologia adaptada de Santos (2016) para obtenção do inóculo que foi adicionado às plantas de tomate, o fungo foi repicado em 5 placas de Petri (150x15mm), com meio de cultura BDA, vedado e acondicionado em BOD (25 °C e fotoperíodo de 12 horas) durante 5 dias. Para obtenção de maior quantidade de micélio e escleródios destinados à inoculação, utilizou-se 5g de arroz parboilizado para cada placa. Esse arroz foi submerso em água destilada por 2 horas, e posteriormente, foi coberto com papel laminado e autoclavado. Assim, o arroz foi distribuído sobre a colônia do fungo e as placas foram vedadas e colocadas em BOD por mais 5 dias. Após o crescimento micelial e formação de escleródios sobre o arroz (Figura 1A), a placa foi dividida em 8 partes (Figura 1B), sendo adicionado 1/8 de inóculo em cada vaso contendo as plantas de tomate (Figura 1C) e realizando a incorporação leve desse inóculo no solo (Figura 1D). Assim, foram colocados sacos plásticos transparentes sobre as plântulas a fim de aumentar a temperatura e umidade.

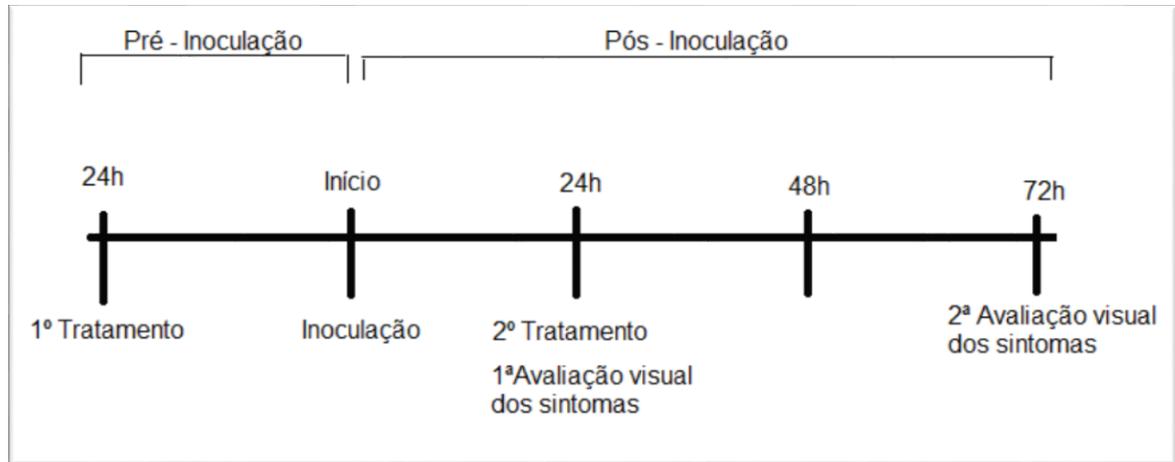


**Figura 1.** Crescimento micelial do fungo e escleródios sobre arroz autoclavado após incubação durante 5 dias (A). Divisão da placa em 8 partes (B), distribuição de 1/8 de inóculo em cada vaso (C) e sua incorporação leve no solo (D).

O tratamento com os óleos essenciais, o fungicida e H<sub>2</sub>O foi realizado em dois momentos, sendo 24h antes da inoculação do fungo e 24h após essa inoculação (Figura 2). O primeiro tratamento realizado na pré-inoculação com propósito de observar uma resposta de prevenção à infecção do fungo; e o segundo tratamento, pós-inoculação realizado a fim de controle da infecção. Os tratamentos foram realizados por pulverização sobre as plântulas com auxílio de pulverizador manual pequeno. Foi utilizada uma quantidade de 120mL de água para formar a solução com os óleos essenciais e fungicida, de acordo com as suas doses e concentração.

Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foram feitas duas avaliações visuais, sendo elas realizadas 24h e 72h após a inoculação (Figura 2). Essas avaliações consistiram na observação da incidência da doença através da presença de plantas com sintomas de

constricção do colo e tombamento, sintomas característicos da doença. Realizou-se uma análise descritiva com as avaliações visuais obtidas.



**Figura 2.** Esquematização dos períodos entre as atividades de inoculação, tratamentos e avaliações visuais do experimento da germinação *in vivo*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

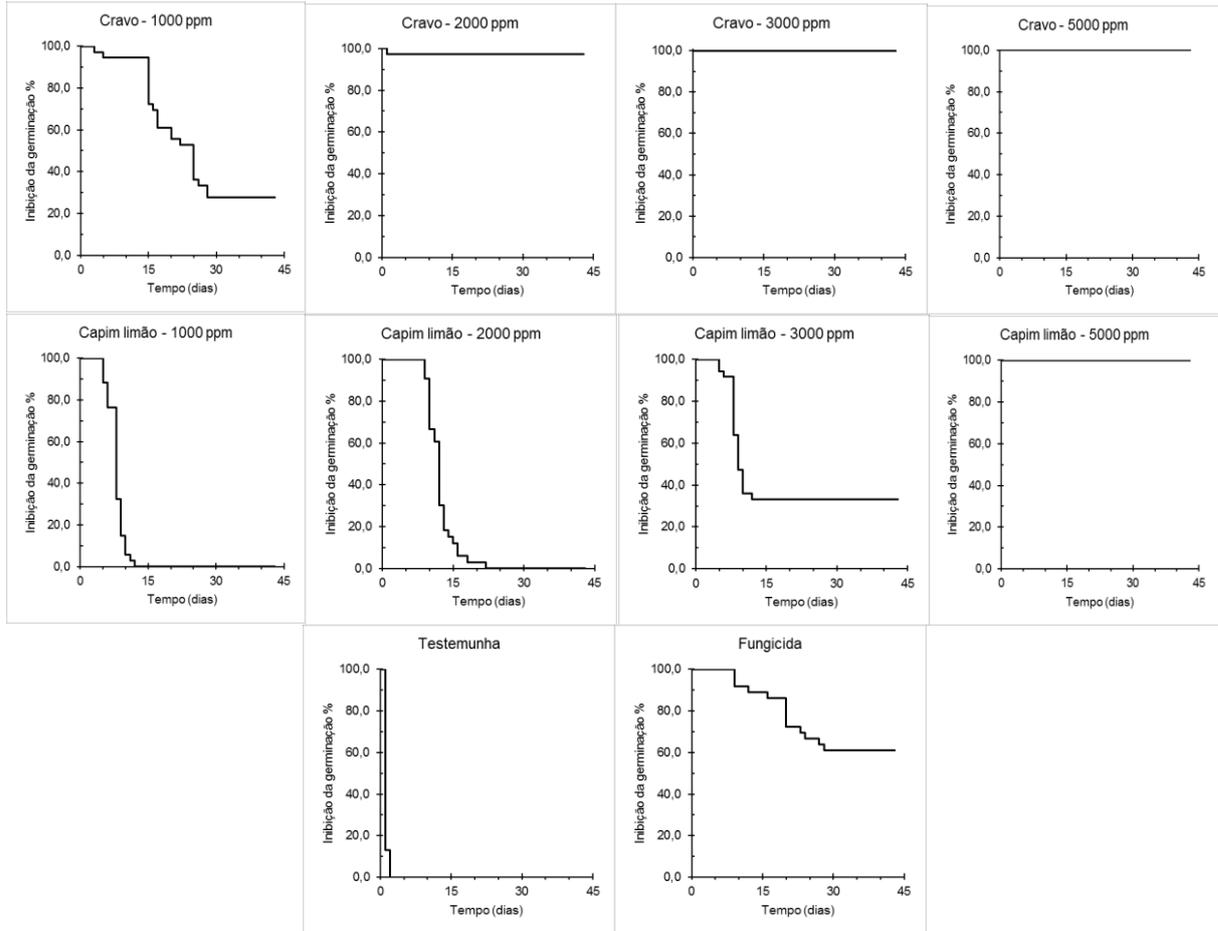
### 4.1 AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO E VIABILIDADE *IN VITRO*

Com os dados em relação à inibição de germinação dos escleródios tratados com os óleos essenciais, fungicida e H<sub>2</sub>O (Figura 3) pode-se verificar que o óleo essencial de cravo da índia na sua concentração de 1000ppm inibiu a germinação de aproximadamente 30% dos escleródios até por volta do 30º dia, sendo que também os escleródios começaram a germinar logo nos primeiros dias da avaliação. A concentração de 2000ppm apresentou apenas 2% de escleródios germinados no primeiro dia, mantendo 98% de inibição da germinação até o 40º dia de avaliação. Já nas concentrações de 3000 e 5000 ppm ocorreu 100% de inibição dos escleródios durante o período avaliado.

Os resultados obtidos a partir do óleo essencial de capim limão demonstraram que nas doses de 1000 e 2000ppm a germinação dos escleródios foi inibida até o 5º e 9º dia, respectivamente, sendo que aos 13 dias de avaliação na dose de 1000ppm todos os escleródios já haviam germinado e na dose de 2000ppm isso ocorreu no 20º dia. Já na dose 3000ppm a inibição total permaneceu até o 5º dia e a parcial de até 33% de inibição até o último dia de avaliação. Na dose de 5000ppm não houve germinação dos escleródios até o 40º dia.

Dos resultados obtidos em relação aos tratamentos controle, o fungicida fluazinam inibiu a germinação de 100% dos escleródios até o 9º dia, mas permaneceu com uma inibição de até 60% do 28º dia até o último dia de avaliação. Já a testemunha (H<sub>2</sub>O), a partir do 2º dia apresentou germinação de todos os escleródios testados.

Os dados descritivos do teste de TCT (Tabela 1) demonstraram que os escleródios não germinados tratados com o óleo essencial de cravo da índia nas doses de 3000 e 5000 ppm obtiveram 10% e 0% de viabilidade, respectivamente. Os resultados quanto ao óleo essencial de capim limão nas doses de 3000 e 5000 ppm tiveram 20% e 40% de viabilidade, respectivamente. No tratamento com fungicida fluazinam 100% dos escleródios testados encontravam-se viáveis, da mesma maneira que ocorreu com os óleos essenciais em suas doses de 1000 e 2000 ppm e com a testemunha (H<sub>2</sub>O).



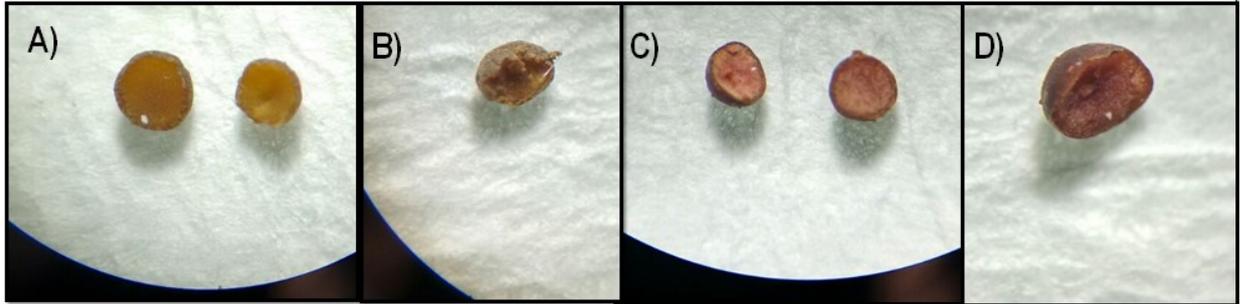
**Figura 3.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a porcentagem de inibição da germinação dos escleródios do fungo *S. rolfsii* tratados com os óleos essenciais de cravo da índia e capim limão nas doses de 1000, 2000, 3000 e 5000 ppm, fungicida fluazinam e testemunha (H<sub>2</sub>O).

**Tabela 1.** Porcentagem de viabilidade de escleródios do fungo *S. rolfsii* pelo teste TCT sob tratamento com óleos essenciais de cravo da índia e capim limão nas doses 1000, 2000, 3000 e 5000 ppm, fungicida fluazinam (Fung.) à 1% e testemunha (H<sub>2</sub>O) (Test.).

Tratamentos	Test.	Fung.	Cravo da índia (ppm)				Capim limão (ppm)			
			1000	2000	3000	5000	1000	2000	3000	5000
<b>Viabilidade de Escleródios (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

No teste TCT a ausência de coloração interna confirma a inativação dos escleródios tratados com os óleos, isso ocorre devido à desnaturação proteica e inibição da atividade das enzimas desidrogenases que auxiliam na respiração celular do escleródio. Quando a coloração interna apresenta coloração avermelhada ou rosada, os escleródios estão viáveis, isso porque a substância trifetil cloreto de tetrazólio ao entrar em contato com as enzimas desidrogenases

ativas desencadeia uma reação química que promove a coloração das células do escleródio (MARTINS et al., 2003). Essa diferença de coloração pode ser observada na Figura 4.



**Figura 4.** Alguns resultados do teste TCT. Escleródios submetidos ao tratamento com óleo de Cravo-5000ppm (A) e Cravo-3000ppm (B); fungicida fluazinam – 1% (C); e testemunha (H<sub>2</sub>O) (D). Escleródios inviáveis em A e B, e escleródios ainda viáveis em C e D.

A partir do exposto, observa-se que as maiores doses de cravo (2000, 3000 e 5000ppm) e a maior dose de capim limão (5000ppm) se mostraram eficientes na inibição da germinação dos escleródios no período avaliado. Já no teste de viabilidade, as maiores doses (3000 e 5000ppm) de cravo apresentaram os melhores resultados quanto à inativação desses escleródios, isto é, 90% a 100% dos escleródios foram inviabilizados após o tratamento com essas doses do óleo, evidenciando a eficiência do mesmo em inativar (causar a morte) os escleródios.

O potencial de inibição de germinação e inativação dos escleródios deve-se as substâncias constituintes desses óleos. O óleo de cravo é composto em sua maioria pela substância eugenol que possui propriedades antifúngicas e é extremamente concentrado e hidrofóbico por apresentar essas características, ao ser adicionado em água não ocorre sua diluição, então o eugenol se adere a superfície do escleródio que irá absorvê-lo nessa forma concentrada (VENTUROSOSO et al., 2011), o que justifica a eficiência do óleo tanto na inibição da germinação quanto na inativação dos escleródios. Já no óleo de capim limão a principal substância presente é o citral que possui potencial fungistática e fungicida (NASCIMENTO et al., 2003), sua eficiência foi acentuada na inibição da germinação, mostrando-se um bom composto fungistático, porém na inativação mostrou resultados inferiores aos tratamentos com as maiores doses de cravo.

No tratamento com fungicida fluazinam, apesar de apresentar bons resultados no teste de germinação, no teste TCT não houve capacidade em inativar os escleródios. Essa característica também confere ao fungicida uma boa propriedade fungistática, porém acredita-se que quando o efeito residual do produto se expira, o escleródio, que não foi inviabilizado

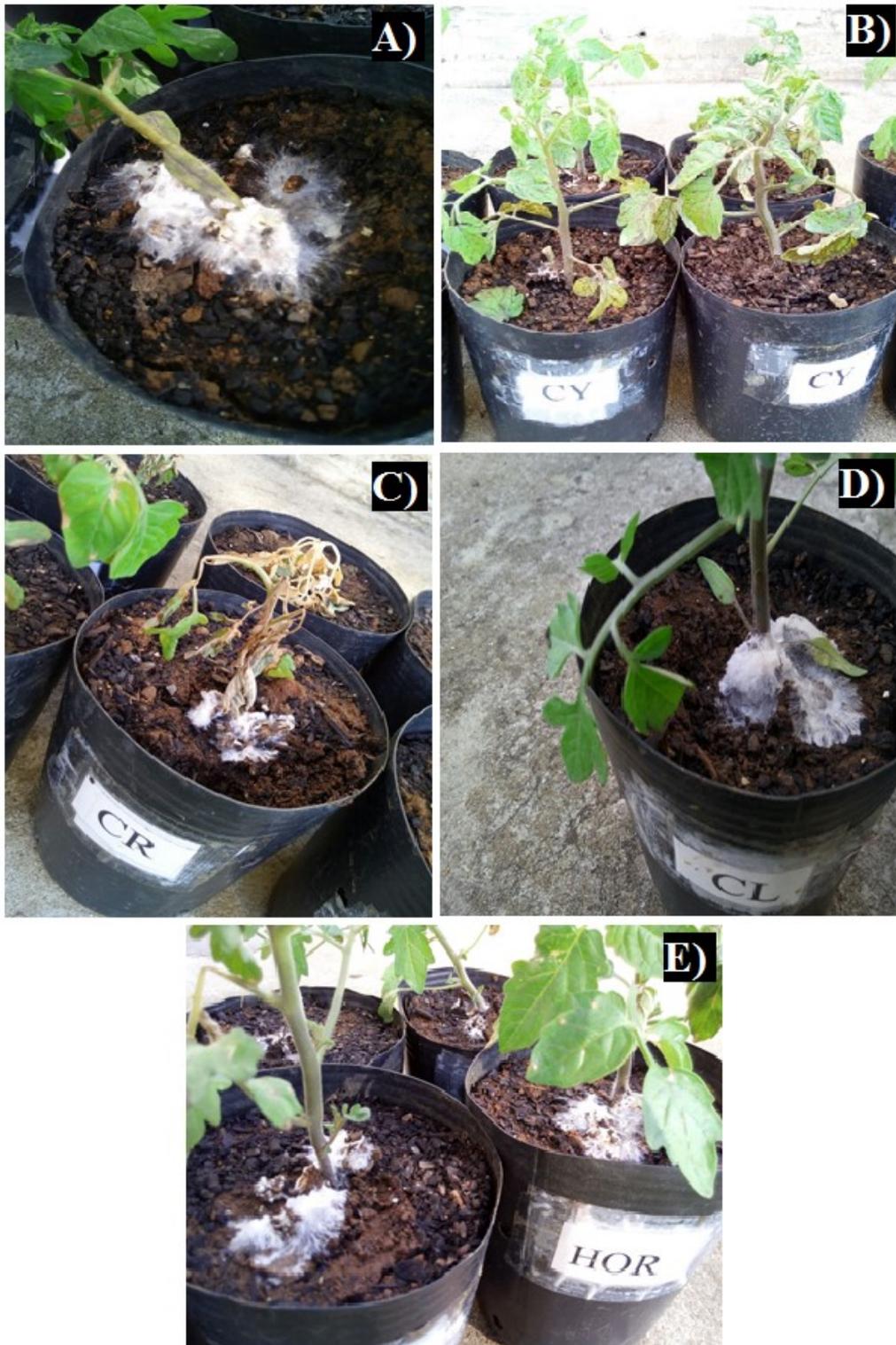
pelo produto, pode germinar, quando encontra condições ambientais ideais, e afetar a cultura presente.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA DOENÇA *IN VIVO*

Os resultados obtidos das avaliações visuais (Tabela 2) demonstram que em casa de vegetação, os óleos essenciais não obtiveram eficiência de controle na dose testada, assim também como a testemunha (H<sub>2</sub>O). O primeiro tratamento não atuou como preventivo de infecção, pois houve o ataque do fungo às plantas de tomate e o segundo tratamento não obteve controle sobre o fungo já em desenvolvimento. Contudo, além dos sintomas de infecção da doença, o óleo essencial de cravo da Índia, na dose testada, causou toxicidade às plantas. O fungicida fluazinam obteve resultados positivos nesse controle, pois atuou como preventivo e não permitiu o ataque do fungo às plantas. Os sintomas descritos podem ser visualizados na Figura 5.

**Tabela 2.** Resultados das avaliações visuais obtidas após os tratamentos com os óleos essenciais de cravo da Índia, capim limão e hortelã na dose de 5000ppm; fungicida fluazinam na concentração de 1% e testemunha (H<sub>2</sub>O).

TRATAMENTOS	SINTOMAS	
	1ª Avaliação Visual	2ª Avaliação Visual
<b>Testemunha (H<sub>2</sub>O)</b>	Não houve prevenção à infecção do fungo. Presença de micélio no colo das plantas, causando tombamento.	Não houve inibição do crescimento micelial. Clorose e murchamento de plantas tombadas.
<b>Fungicida Fluazinam (1%)</b>	Ausência de sintomas. Controle efetivo do desenvolvimento do fungo.	Ausência de sintomas. Controle efetivo do desenvolvimento do fungo.
<b>Cravo da Índia (5000 ppm)</b>	Murchamento e clorose das folhas do ápice, indicando fitotoxicidade. Presença de micélio causando constrição do colo das plantas.	Plantas inteiramente secas e necrosadas pela fitotoxicidade. Não houve inibição do crescimento micelial, causando tombamento das plantas.
<b>Capim limão (5000 ppm)</b>	Não houve prevenção à infecção do fungo. Presença de micélio no colo das plantas, causando constrição.	Menor velocidade de crescimento micelial. Micélio provocou tombamento das plântulas.
<b>Hortelã (5000 ppm)</b>	Não houve prevenção à infecção do fungo. Presença de micélio no colo das plantas, causando constrição.	Menor velocidade de crescimento micelial. Micélio provocou tombamento das plantas.



**Figura 5.** Alguns resultados da avaliação da germinação *in vivo*. Micélio ao redor do colo causando tombamento da planta tratada com H<sub>2</sub>O (testemunha) (A). Ausência de sintomas em plantas tratadas com fungicida fluazinam (B). Sintomas de fitotoxicidade em planta tratada com óleo de cravo da índia na dose de 5000 ppm (C). Micélio causando constrição do colo de planta tratada com óleo de capim limão na dose de 5000ppm (D). Presença de micélio no colo da planta tratada com óleo de hortelã na dose de 5000ppm (E).

Entretanto, os óleos de capim limão e hortelã diminuíram, visualmente, a velocidade de crescimento micelial do fungo quando comparados à testemunha, pois observou-se na 2ª avaliação visual uma menor quantidade de micélio sobre o solo das plantas tratadas com os determinados óleos. O mesmo ocorreu em experimento preliminar de Itako et al (2017) onde os óleos essenciais de *S. aromaticum*, *C. citratus*, *E. citriodora* e *M. arvensis*, nas doses de 500 e 1000ppm, inibiram totalmente o crescimento micelial dos fungos *S. rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e na dose de 250ppm, diminuíram a velocidade desse crescimento. Ainda para o óleo essencial de *M. arvensis*, Chaussê et al (2011) observaram em seu estudo que o crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* foi inibido em uma concentração do óleo de 0,75 µL/mL, mas utilizando doses de 0,25 e 0,50 µL/mL já se evidenciou a diminuição da velocidade de crescimento micelial desse fungo.

Diante dos resultados obtidos através das avaliações de germinação *in vivo* e *in vitro*, constata-se que outros autores também chegaram a resultados semelhantes, como Dias-Arieira et al. (2010) que observaram a eficiência do óleo de *E. citriodora* na inibição do crescimento micelial de *C. acutatum*, mas em condições de campo não constataram potencial no controle do fungo. Também, Inácio et al. (2009) que em seu trabalho com óleos de erva-cidreira (*Melissa officinalis*), capim-cidreira (*C. citratus*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), observaram a eficiência dos mesmos na inibição e diminuição do desenvolvimento dos fungos *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina in vitro*, porém, quando aplicados à campo, não obtiveram resultados positivos, assim, ainda sugerem a adição de compostos que reduzam a evaporação dos óleos essenciais.

O fato dos óleos terem expressado potencial somente *in vitro* e não *in vivo*, pode ter relação com diversos fatores, um deles pode ter ligação com a característica de volatilidade desses óleos. Os óleos essenciais são extremamente voláteis (STEFFENS, 2010), por isso, ao entrar em contato com condições ambientais, como vento e radiação, se degradam facilmente. Em campo e casas de vegetação é comum encontrar altas temperaturas, condição que facilita a volatilização, nesse caso, é necessário o uso de adjuvantes para melhorar essa característica e diminuir a degradação dos óleos essenciais.

A ação fitotóxica causada pelo óleo essencial de cravo na dose de 5000ppm nas plântulas de tomate, permite observar a necessidade de realizar outros estudos utilizando menores doses do óleo, como no trabalho de Sobrinho et al. (2012) onde avaliaram a fitotoxicidade de *Lippia* sp., *Cymbopogon* sp., *Ocimum* sp., e *Ocimum* spp. nas concentrações

de 0,5%, 1%, 3%, 5%, 7%, 10% e constataram que o óleo essencial extraído do *O. selloi* com as concentrações de 5%, 7% e 10% causaram um efeito fitotóxico em 100% das plantas. Nas concentrações de 1% e 3% a fitotoxicidade ficou em torno de 20% e somente na concentração de 0,5% não houve ação fitotóxica às plantas de meloeiro. Os óleos essenciais *O. gratissium*, *C. citratum*, *L. sidoides* e *O. micrathum*, na concentração de 0,5%, tiveram efeito fitotóxico em torno de 20%.

## 5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de cravo da índia e capim limão apresentaram bons resultados em relação à inibição da germinação e inativação dos escleródios do fungo *S. rolfsii in vitro*. Mostraram-se eficientes nas maiores doses testadas evidenciando seu potencial fungitóxico.

*In vivo*, através da observação incidência da doença sobre as plantas, os óleos essenciais de cravo, capim limão e hortelã não apresentaram eficiência no controle. Além disso, o óleo de cravo da índia causou fitotoxicidade sobre as plântulas de tomate na dose testada.

Acredita-se que o fato dos óleos essenciais não apresentarem bons resultados *in vivo*, esteja ligado à facilidade de volatilização dos mesmos, por isso, é necessário realizar outros estudos utilizando adjuvantes na preparação dos tratamentos para diminuir a volatilização. Sob essas condições, também, no caso do óleo de cravo da índia, seja necessário testá-lo utilizando uma dose menor para evitar a fitotoxicidade sobre as plântulas.

Portanto, o presente estudo, contribuiu com a ampliação da rede de conhecimento no uso de óleos essenciais como alternativa para controle de fungos fitopatogênicos.

## REFERÊNCIAS

- ACHIEME, L. et al. **Produção de escleródios de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* em algodão hidrofílico e papel de filtro**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635p.
- AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. 810p.
- ANDRADE, L. N. T.; NUNES, M. U. C. **Produtos alternativos para controle de doenças e pragas em agricultura orgânica**. Aracaju: Embrapa-Tabuleiros Costeiros, 2001. 20p.
- ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. **A review Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 351-366, 2010.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.
- CHAUSSÊ, T. C. C. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero. **Rev. Bras. Bioci.**, v. 9, n. 4, p. 492-496, 2011.
- CHIAMAÇA, O. M. R. et al. Characterization and *in vitro* antifungal potential of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus* essential oils on phytopathogen *Colletotrichum* sp. **World Journal of Microbiology**, v. 3, n.1, p. 37-42, 2016.
- COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de 79 *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade dos óleos de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathol.**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.
- FARIA, T. J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 71-86, 2006.
- GOOGLE EARTH. **Imagens espaciais do município de Curitiba-SC**, 2014.
- INÁCIO, M. et al. Diagnóstico de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*. In: **2º Jornada Científica da Unemat**, Barra do Bugres, 5 p., 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 1-85, 2014. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_%5Bmensal%5D/Fasciculo](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo)>. Acesso em: 21 de março 2017.

ITAKO, A.T. et al. **Óleos essenciais no desenvolvimento e velocidade de crescimento dos fungos *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. In: 40º Congresso Paulista de Fitopatologia, 2017, Campinas-SP. XL Congresso Paulista de Fitopatologia, 2017.

ITAKO, A. T. et al. *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. **Idesia** (Arica. Impresa), v. 31, p. 11-17, 2013.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.

KUROZAWA C.; PAVAN. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

MARQUES, S. S. et al. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente casual da antracnose em frutos do mamoeiro. In: MARTINS, D. S. **Qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Ed. Incaper., 2003. p. 591-593.

MARTINS, M. V. V. et al. Efeito da temperatura e umidade do substrato na viabilidade de *Sclerotium rolfsii*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 217-222, 2010.

MARTINS, M. V. V. et al. Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes-RJ. **Rev. Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 2003.

MAUDE, R. B. Onion Diseases. In: COOKE, B.M.; JONES, D.G.; KAYE, B. **The Epidemiology of Plant Diseases**. 2 ed. Dordrecht: Springer, 2006. p.506-509.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **Agrofit: consulta de doença**, 2017. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 23 de março de 2017.

MORAIS, L. A. S.; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W. **Óleos essenciais no controle de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 304 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/576737/1/2009AP24.pdf>>. Acesso em: 25 de março de 2017.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

MUELLER, S. et al. **Indicações técnicas para o tomateiro tutorado na Região do Alto Vale do Rio do Peixe**. Florianópolis: EPAGRI, 2008.

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006.

NASCIMENTO, I. B. et al. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 34, n. 2, p. 169- 172, 2003.

PAULA, F. O. et al. Efeito de diferentes óleos essenciais sobre o fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. patógeno da cultura do rabanete. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2014.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R. Ação do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 32-35, 2017.

PELZER, G. Q. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: Singleton, L. L., MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1992. p. 166-170.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus xporlock*. **Food Control**, v. 17, p. 359-364, 2006.

REBELO, J. A. et al. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: tomate**. Florianópolis: EPAGRI, 2000. 67 p.

ROZWALKA, L. C. et al.. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 17-30, 2008.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. Agrotec**, v. 27, n. 1, p. 54-249, 2003.

SANTOS, G. C. **Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais no controle do fungo *Sclerotium rolfsii* na cultura do tomate**. 2016. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2016.

SERRA, I. M .R. S; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão do Estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, 2005.

SILVA, J. S.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, S. P. S. S. Óleo essencial de *Mentha arvensis* L. como agente no controle de fungos fitopatógenos. **Pesq. agropec. pernamb.**, v. 17, p. 99-100, 2012.

SILVA, A. C. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 1853-1860, 2009.

SOBRINHO, R. B. et al. **Avaliação de fitotoxicidade de óleos essenciais de plantas ao meloeiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

SOUSA, R.M.S; SERRA, I.M.R.S; MELO, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 42-47, 2012.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, Centro de Ciências Agrárias, 2004. 294p.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VALLE, R. V.; AGUILAR, M. M. M. Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. em suelos infestados de Aguascalientes y Zacatecas, Mexico. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 22, n. 6, p. 143-146, 2004.

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Antifungal activity of plant extracts on the development of plant pathogens. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

ZANANDREA, I. et al. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 6-14, 2004.