

## EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Fusarium solani* f.sp *glycines*

Daniele Maria do Nascimento<sup>1</sup>, Gustavo Haralampidou da Costa Vieira<sup>2</sup>, Thiago Barbosa Batista<sup>1</sup>, Marli Tieme Koyanagui<sup>3</sup>, Estefânia Martins Bardivieso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Cassilândia (daniele\_ocz@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professor Doutor da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

<sup>3</sup>Mestrado em Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

### RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar o efeito de diferentes óleos essenciais no controle *in vitro* do fungo *Fusarium solani* f.sp *glycines*, causador da fusariose na soja. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, quatro substâncias (óleo essencial de alecrim, anis, cedro e copaíba) e cinco doses (0, 25, 50, 75 e 100 µL/L), com cinco repetições. Discos miceliais colonizados pelo patógeno com 3 mm de diâmetro foram transferidos para meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) acrescidos das referidas substâncias nas diferentes concentrações. Os tratamentos foram mantidos em BOD, com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas por 72 horas, quando foram então realizadas as medições do diâmetro da colônia. As médias obtidas foram submetidas a análise de regressão com auxílio do software SISVAR. Esses dados foram usados para a determinação da porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC). Constatou-se que todos os óleos apresentaram efeito inibitório sobre o patógeno, inibindo acima de 50% do crescimento micelial, e o óleo de anis se mostrou o mais eficaz, inibindo aproximadamente 80%.

**PALAVRAS-CHAVE:** controle alternativo, patógenos, inibição, manejo de doenças.

### EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON GROWTH *IN VITRO* MYCELIAL *Fusarium solani* f.sp *glycines*

#### ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of different essential oils in the *in vitro* control of *Fusarium solani* f.sp *glycines*, which causes fusarium in soybeans. The experimental design was completely randomized in a 4x5 factorial design, four substances (essential oil of rosemary, anise, cedar and copal) and five doses (0, 25, 50, 75 and 100 µL/L), with five replications. Colonized by the pathogen mycelial discs of 3 mm diameter were transferred to means of PDA (potato dextrose agar) added culture of those substances in different concentrations. Treatments were maintained in BOD, with temperature of 28 °C and a photoperiod of 12 hours for 72 hours, when the measurements were then performed on the diameter of the colony. The averages were subjected to regression analysis with the aid of SISVAR software. These data were used to determine the percentage inhibition of mycelial growth (PIC). It was found that all oils had inhibitory effect on the pathogen, inhibiting

more than 50% of mycelial growth, and oil of anise proved more effective, inhibiting approximately 80%.

**KEYWORDS:** alternative control, pathogens, inhibition, disease management.

## INTRODUÇÃO

A fusariose, também conhecida por “síndrome da morte subida” ou “podridão vermelha da raiz” é uma das doenças mais prejudiciais da cultura da soja, causada pelo patógeno *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. Na raiz principal da planta ocorre o aparecimento de manchas avermelhadas, que logo se expandem e circundam toda a raiz, tornando-se vermelho-arroxeadado e por fim, negra. Em condições de alta umidade, forma-se um anel vermelho na haste, coberto por uma massa de coloração bege, que correspondem aos conídios do fungo (AMORIM et al., 2011).

Já foram desenvolvidas no Brasil cultivares resistentes a fusariose (EMBRAPA, 1997), entretanto esse método é pouco eficiente. Sendo assim, a utilização de fungicidas representa a alternativa mais viável de controle, mas sabe-se que o seu indiscriminado seleciona patógenos resistentes (GHINI & KIMATI, 2000), e ocasiona danos à saúde humana e ao meio ambiente. Esses últimos fatores têm sido mais impactantes, visto que temas como “sustentabilidade” e “agricultura orgânica” tem recebido destaque, devido a conscientização crescente das pessoas em relação aos produtos consumidos e a forma em que foram produzidos.

Os produtores de soja orgânica brasileira são também os maiores produtores mundiais, e se veem sem uma alternativa para o controle da fusariose, uma vez que o uso de fungicidas químicos são restritos no sistema orgânico de produção (MEDICE et al., 2007). A utilização de óleos essenciais e/ou extratos brutos de vegetais tem se mostrado uma alternativa promissora no controle de doenças, e tem sido amplamente relatado na literatura (SCHAWAN-ESTRADA et al., 2000). O potencial desses óleos essenciais se dá tanto por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quando pela indução de fitoalexinas, metabólitos secundários produzidos pelas plantas em condições de estresse, podendo impedir a atividade de agentes patogênicos (STANGARLIN et al., 1999).

Além disso, eles proporcionam maior segurança as pessoas e ao meio ambiente por reduzirem os resíduos químicos e possuir baixo risco de desenvolvimento de resistência nos microrganismos patogênicos, uma vez que são formados por uma mistura de componentes (MOURA, 2007). Dentro deste contexto, objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência de óleos essenciais no controle do crescimento *in vitro* de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de Estudos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitossanidade da UEMS, Unidade Universitária de Cassilândia/MS, de março/2013 a julho/2014.

### Obtenção e repicagem do patógeno

O fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, cadastrado como MMBF 86-09, foi adquirido da Coleção de Culturas Fúngicas, Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, Instituto Biológico, de São Paulo (SP) e isolado de plantas de soja em 2009.

O isolado foi repicado infectando-se a ponta de uma pinça esterilizada com o patógeno, e realizando-se três riscos em placas de petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas em BOD a 28°C e

fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando foram repicados os discos miceliais para realização do experimento.

### Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de copaíba, alecrim, cedro e anis foram adquiridos da empresa Oficina de Ervas, registrada na Anvisa sob o nº CEVS 354340218-477-000401-1-8.

### Efeito fungicida dos óleos essenciais

O efeito fungicida dos óleos essenciais foi determinado acrescentando-se essas substâncias nas referidas concentrações ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Quatro discos de 3 mm de diâmetro de ágar, colonizados pelo fungo, foram transferidos para as placas contendo os tratamentos, e mantidos à 28°C pelo período de 72 h. As avaliações do efeito fungicida dessas substâncias foram realizadas após 72 horas da repicagem, através da medição do diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas).

Paralelo aos testes foi mantido um grupo controle, composto apenas pelo meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, quatro substâncias (óleo essencial de copaíba, alecrim, cedro e anis) e cinco doses (0, 25, 50, 75 e 100µL), com cinco repetições. As médias foram submetidas a análise de regressão com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2000).

### Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC)

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada a partir dos resultados obtidos nos tratamentos. Esses valores foram definidos usando-se a fórmula:

$$\text{PIC} = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} / \text{diâmetro da testemunha}) \times 100$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

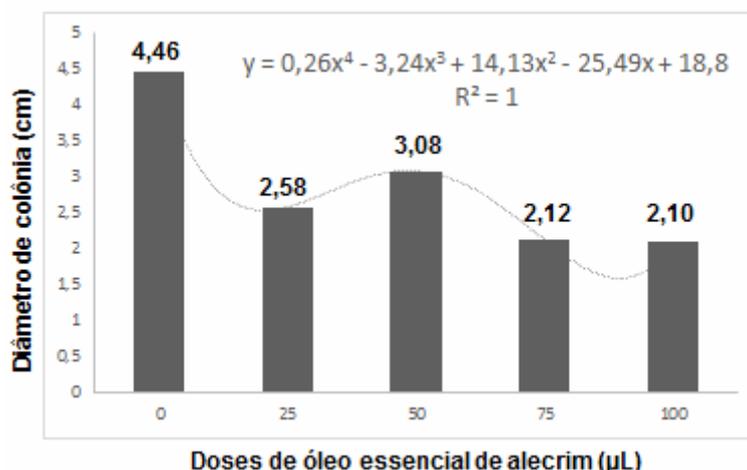
Os dados de porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* estão dispostos na Tabela 1.

**TABELA 1.** Porcentagem de inibição de crescimento (PIC) do fungo *Fusarium solani* f.sp. *glycines* expostos a tratamentos com óleos essenciais em diferentes concentrações.

Óleos essenciais	PIC (%)			
	25µL	50µL	75µL	100µL
Alecrim	42,15	30,94	52,46	52,91
Anis	41,70	55,60	79,37	62,02
Cedro	53,36	49,77	47,08	52,46
Copaíba	13,45	28,69	36,32	57,84

Cassilândia/MS, 2014.

Conforme observado (Tabela 1; Figura 1) o óleo essencial de alecrim se mostrou o menos eficiente no controle *in vitro* do patógeno, dentre as concentrações utilizadas, as doses de 75 e 100 µL inibiram, respectivamente, 52,46% e 52,91% do crescimento micelial do fungo, se mostrando as mais eficazes dentre as concentrações utilizadas.

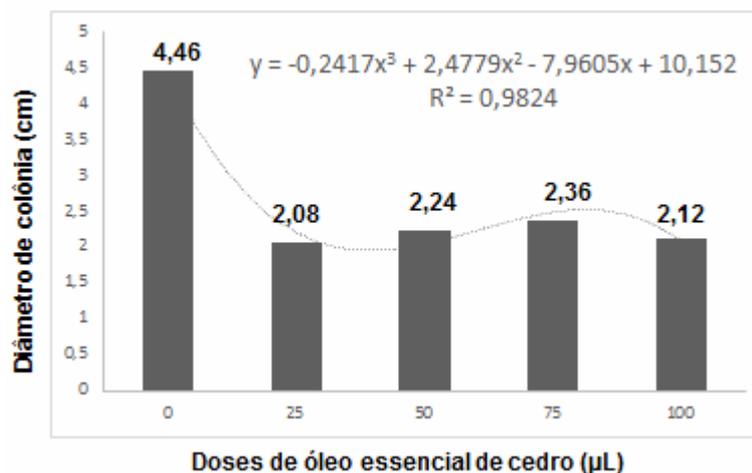


**FIGURA 1.** Efeito de doses de óleo essencial de alecrim no diâmetro de colônia (cm) de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* após 72 horas de repicagem. Cassilândia/MS, 2014.

Esses resultados contrastam com os obtidos por PEREIRA et al., (2006), que observaram uma tendência de aumento nos índices de inibição proporcional ao aumento da concentração testada, entretanto, na maior dose usada, de 200µg/ml do óleo, o fungo *Fusarium* sp. obteve um crescimento micelial de 6,13cm, valor esse superior ao obtido nesse experimento na dose de 75µL. Segundo SILVA (2006), a composição química dos óleos varia de acordo com a idade da planta, tipo de tecido, solo e seu habitat, explicando assim a discrepância encontrada em pesquisas realizadas com o mesmo patógeno e a mesma espécie de planta.

SILVA et al., (2009) relataram a eficiência do óleo essencial de alecrim no controle *in vitro* de *C. gloeosporieoides*, inibindo completamente a germinação de esporos e o crescimento micelial na dose de 100µL.

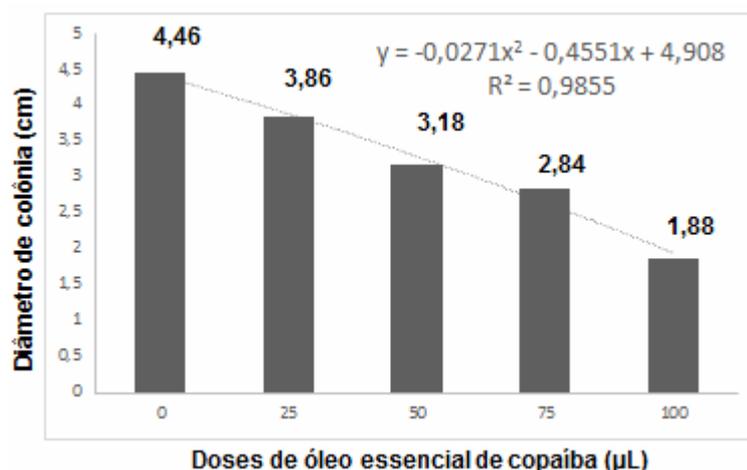
Para o óleo essencial de cedro, com exceção das doses de 50 e 75uL, as demais conseguiram um índice de inibição acima de 50%, sendo 53,36% e 52,46% para as concentrações de 25 e 100µL, respectivamente. O menor desenvolvimento de colônia foi obtido na menor dose, com 2,08cm de diâmetro de colônia do fungo. (Tabela 1 e Figura 2). Na literatura não há relatos da utilização desse óleo no controle de fitopatógenos.



**FIGURA 2.** Efeito de doses de óleo essencial de cedro no diâmetro de colônia (cm) de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* após 72 horas de repicagem. Cassilândia/MS, 2014.

Em relação ao óleo essencial de copaíba, o crescimento micelial do fungo se mostrou inversamente proporcional as doses testadas, sendo que na dose de 100µL foi observado o menor diâmetro de colônia, de 1,88cm, o que corresponde a 57,84% de inibição (Tabela 1 e Figura 3).

SOUSA et al. (2012) verificaram inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* nas concentrações de 0,2% e 1% do óleo de copaíba, entretanto, não observaram uma relação direta entre a inibição e a concentração usada, conforme ocorrido nesse trabalho. ISHIDA et al. (2008) já relatou o efeito fungicida desse óleo sobre o gênero *Fusarium*, inibindo o crescimento de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* na concentração de 1000 ppm.

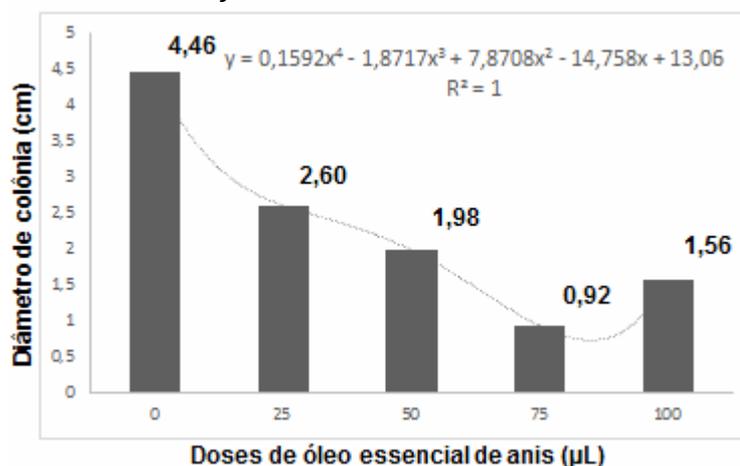


**FIGURA 3.** Efeito de doses de óleo essencial de copaíba no diâmetro de colônia (cm) de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* após 72 horas de repicagem. Cassilândia/MS, 2014.

Dentre os quatro óleos essenciais testados, o anis demonstrou ter maior efeito inibitório, obtendo o fungo um diâmetro de 0,92cm na dose de 75µl (79,37% de

inibição), na concentração seguinte, de 100µL, o patógeno retomou o seu crescimento, o que indica ser a dose de 75µL a ideal para controle *in vitro* do *Fusarium solani* f.sp *glycines* (Tabela 1 e Figura 4).

A utilização do óleo essencial de anis para controle de patógenos já foi relatada por NETO et al. (2012), MEDEIROS et al. (2011) e LEITE et al. (2011) que reduziram a incidência de fungos ao tratar sementes de erva-doce, flamboyant-mirim e sabiá com o óleo nas concentrações de 2%.



**FIGURA 4.** Efeito de doses de óleo essencial de anis no diâmetro de colônia (cm) de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* após 72 horas de repicagem. Cassilândia/MS, 2014.

Diante os resultados obtidos, que mostram o efeito fungitóxico *in vitro* desses óleos sobre *Fusarium solani* f.sp *glycines*, sugere-se a realização de experimentos *in vivo*, a fim de comprovar se os efeitos permanecem nas plantas em campo.

## CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de alecrim, anis, cedro e copaíba possuem ação inibitória sobre *F. solani* f.sp *glycines*, apresentando índices de inibição superiores a 50%, destacando se o óleo de anis, que inibiu aproximadamente 80% do crescimento micelial do patógeno.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. Piracicaba/SP: Ceres, 4.ed, v.1, 704p, 2011.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Recomendações técnicas para a cultura de soja na Região Central do Brasil 1997/98**. Londrina, 1997. 171p. (EMBRAPACNPSo. Documentos, 106).

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja Região Central do Brasil 2004**. Londrina: Embrapa Soja, 237 p. 2005.

GHINI, R. e KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna/SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002, 78p, v.2, 2002.

ISHIDA, A. K. N.; AMARAL, M. A. C. M.; GURGEL, E. S. C; TREMACOLDI, C. R. e SOUZA FILHO, A. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Copaifera* sobre *Fusarium solani* f.sp. *piperis* Albuquerque. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRICOLAS NATURAIS, n.4, 2008, Belém/PA. **Anais...** Belém/PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. p.46.

LEITE, R. P.; MEDEIROS, J. G. F.; NASCIMENTO, L. C. Produtos naturais e seus efeitos sobre a micoflora e fisiologia em sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). In: Seabra, G.; Mendonça, I. (eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, p.559-564.2011.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JÚNIOR, R. G. M.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.31, n.1, 83-90, 2007.

MEDEIROS, J. G. F.; LEITE, R. P.; NASCIMENTO, L. C. Extratos vegetais e seus efeitos na sanidade e fisiologia de sementes de flamboyant-mirim (*Caesalpinia pulcherrima* L.). In: Seabra, G.; Mendonça, I. (eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, p.373-377.2011.

MOURA, R. D. **Produtos biológicos e alternativos no controle de doenças pós-colheita em melão cantaloupe**. Dissertação de Mestrado – Agronomia. Mossoró, RN: Universidade Federal Rural do Semi-árido, 2007.

NETO, A. C. A; ARAÚJO, P. C; SOUZA, W. C. O; MEDEIROS, J. G. F. e AGUIAR, A. V. M. Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* mill.). **Revista Verde** (Mossoró/RN), v.7, n.1, p.170-176, 2012.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. G.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICOLLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. e CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v.30, n.12, p.129-137, 2000.

SOUSA, R. M. S; SERRA, I. M. R. S e MELLO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. 1102 p.

SILVA, A. C.; SALES, N. L. P.; ARAUJO, A. V.; JÚNIOR, C. F. C. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado

do maracujazeiro. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1853-1860, 2009.

SILVA, G. Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 9, agosto, 2006.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.