

Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* “in vitro”

Antifungal activity of plant extracts on the mycelial growth Lasiodiplodia theobromae “in vitro”

DIAS, Fabiane Miranda¹; MATOS, Dilânia Lopes¹; DAVID, Grace Queiroz¹; PERES, Walmor Moya¹.

¹Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, fabiane15miranda@hotmail.com, dilan_lopes@hotmail.com, gracequeiroz david@hotmail.com, walmorperes@unemat.br.

Resumo: O controle alternativo requer práticas que reduzam o uso de defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças, visando menor impacto ao meio ambiente, ao homem e redução no uso e custos do controle químico. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos extratos de anis-estrelado (*Illicium verum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), louro (*Laurus nobilis* L.), orégano (*Oreganum vulgare*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) sobre o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*, in vitro. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos (6 extratos vegetais mais testemunha sem extrato), com 5 repetições cada. Para a obtenção dos extratos aquosos, utilizou-se água destilada estéril como meio extrator, os mesmos foram incorporados ao meio de cultura BDA. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas por meio da medição do crescimento micelial (mm) do fungo obtendo-se as variáveis crescimento médio micelial, índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição do crescimento (PIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Foi verificado que houve inibição total do crescimento micelial do fungo *L. theobromae* tratado com os extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado. Nos tratamentos com extratos de pimenta-do-reino e canela foi verificado crescimento micelial, mas os mesmos diferiram significativamente em relação à testemunha, para os demais, não houve efeito significativo. Os resultados obtidos indicaram efeito promissor dos extratos de canela e anis-estrelado sobre o crescimento micelial in vitro do fungo *L. theobromae*.

Palavras-chave: controle alternativo, ação fungistática, fitopatógeno.

Abstract: The alternative requires control practices that reduce the use of pesticides to control pests and diseases, targeting less impact to the environment, to human and reduction in the use and chemical control costs. The objective was to evaluate the effect of star anise extracts (*Illicium verum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove (*Syzygium aromaticum* L.), laurel (*Laurus nobilis* L.), oregano (*Oreganum vulgare*) and black pepper (*Piper nigrum*) on mycelial growth *Lasiodiplodia theobromae* in vitro. The design was completely randomized with 7 treatments (6 plant extracts more control without extract) with 5 repetitions each. To obtain the aqueous extracts used is sterile distilled water as extractant, they were added to PDA culture medium. The evaluations were performed every 24 hours by measuring the mycelial growth (mm) of the fungus getting the variables mycelial average growth rate index of mycelial growth (MIGS) and growth inhibition percentage (PIC). The



data were submitted to analysis of variance and the means compared by Tukey test at 1% probability. It was found that there was total inhibition of mycelial growth of the fungus *L. theobromae* treated with clove India extracts and star anise. In the treatments with black pepper kingdom and cinnamon extracts was found mycelial growth, but differed significantly in comparison to, for others, there was no significant effect. The results showed promising effect of cinnamon extracts and star anise on in vitro mycelial growth of the fungus *L. theobromae*.

Keywords: alternative control, fungistatic action, phytopathogen.

Introdução

Tem-se buscado inserir táticas alternativas de controle no manejo de doenças de plantas, como o uso de fungicidas naturais de origem botânica e controle biológico, além do recente emprego da nanotecnologia (CARNEIRO et al., 2007). O controle alternativo requer práticas que reduzam o uso dos defensivos agrícolas para controle de agentes fitopatogênicos, visando menor impacto ao meio ambiente, ao ser humano e redução de custos em relação ao controle químico (SILVA et al., 2005).

O uso de extrato vegetais no controle de doenças de plantas é amplamente estudado, sendo normalmente utilizado por agricultores que praticam a agricultura orgânica (POTENZA, 2004). A principal vantagem do uso desses extratos na proteção de plantas, quando comparados aos produtos sintéticos, deve-se ao fato de gerar novos compostos, aos quais os patógenos não se tornaram capazes de inativar, além da menor toxidez, degradar rapidamente no ambiente, possuir um amplo modo de ação e serem derivados de recursos renováveis (FERRAZ et al., 2008).

Conforme Kuhn et al. (2009) as doenças estão entre os principais fatores que restringem a obtenção de altos rendimentos nas culturas. Os fungos constituem um grupo numeroso e bastante diversificado de agentes causais de doenças em plantas, sendo muitos deles responsáveis por grandes prejuízos econômicos. (RESENDE; CASTRO, 2000). Dentre esses, encontra-se *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl., patógeno comumente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais. Capaz de causar sérios prejuízos a numerosas espécies cultivadas (BURGESS et al., 2006).

No Brasil, apesar do reconhecido avanço em termos de modelos de produção e de alternativas de controle fitossanitário, adotados em diferentes regiões do país, é irrefutável o passivo decorrente de práticas de produção convencional, bem como a ausência de controle fitossanitário nas áreas de produção (MICHEREFF; BARROS, 2001).



Frente a estes problemas, a agricultura alternativa, ou agricultura sustentável, obtêm expressão política (ZADOKS, 1992) e evidencia a necessidade de se procurar novas formas de proteção das plantas contra as doenças.

Tendo em vista a propriedade inibitória de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos e a importância de *L. theobromae*, para diversas culturas, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *L. theobromae* in vitro.

Metodologia

O experimento foi conduzido em fevereiro de 2016, no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, localizado na MT 208, Km 143, no município de Alta Floresta.

O isolado do fungo *Lasiodiplodia theobromae* utilizado foi fornecido pela micoteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, conservado pelo método Castellani (1939). As culturas puras do fungo foram mantidas em placa de Petri em meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubadas em B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas em temperatura de 27°C por período de 7 dias.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), contendo 7 tratamentos (6 extratos vegetais mais testemunha sem adição de extrato), 5 repetições com 4 placas cada. A parcela foi composta por 20 placas de Petri contendo o fitopatógeno.

Os extratos vegetais utilizados foram de anis-estrelado (*Illicium verum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), louro (*Laurus nobilis* L.), orégano (*Oreganum vulgare*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), adquiridos em mercado local. Para o preparo dos extratos foi utilizado 20 gramas de cada material vegetal, aos quais se acrescentou, separadamente, 100 mL de água destilada estéril, posteriormente, cada mistura foi triturada durante 3 minutos, com uso de liquidificador. Em seguida, foram peneiradas e submetidos a 1 hora em banho-maria em temperatura de 65°C.

Para avaliar o efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial do *L. theobromae*, foi utilizada a concentração de 10% de cada extrato vegetal, em meio de cultura batata-dextrose-ágar em placas de Petri de 9 cm Ø. Para isso, foram transferidos, individualmente, no centro de cada placa um disco de 9 mm Ø contendo cultura pura de *L. theobromae* com 7 dias de idade. Posteriormente, incubadas em ambiente controlado (sala de crescimento) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 27 °C.

As avaliações consistiram na medida (mm) do crescimento micelial do fungo *L. theobromae*, obtendo-se médias do crescimento micelial diário do diâmetro da colônia. Estas foram realizadas por período de tempo em que testemunha levou para colonizar toda a superfície do meio, de modo a atingir a borda da placa de Petri.

As variáveis analisadas foram o crescimento médio micelial (CMM), obtido mediante medidas diárias do crescimento micelial (mm) do diâmetro da colônia do fungo. A partir das médias dos valores diários de crescimento micelial, obteve-se o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e o percentual de inibição de crescimento (PIC).

A variável Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi obtida conforme fórmula proposta por Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial;

D= Diâmetro médio atual da colônia;

D_a= Diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= Número de dias após a inoculação

A Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha foi obtida por meio da fórmula de Abbott, (1925):

PIC – {(diâmetro da testemunha – diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha} x 100

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de comparação de médias Tukey ao nível de significância de 1% de probabilidade, por meio do programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussões

Os resultados demonstraram efeito significativo dos extratos avaliados, sobre crescimento micelial do fungo *L. theobromae*, exceto para extratos de orégano e louro. Os menores valores médios de crescimento micelial foram verificados para os extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado, como observado na tabela 1, apresentaram total ação fungistática, evidenciada pelo não crescimento micelial do fungo, comprovando a possível ação fungitóxica destes extratos.

Na natureza, extratos vegetais produzem compostos voláteis que pode induzir, inibir a germinação ou o crescimento de microrganismos, desencadear alterações no desenvolvimento de plantas e fungos (FRENCH, 1992).

Tabela 1. Crescimento médio micelial (CMM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *L. theobromae* sob o efeito de extratos vegetais.

ExtratosCMM (mm)		IVCM
	2º Dia	3º Dia	
Cravo	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Anis-estrelado	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Pimenta-do-reino	4,10 b	22,70 b	9,30 b
Canela	3,90 b	24,07 c	10,09 b
Orégano	12,04 c	40,00 d	12,39 c
Louro	12,43 c	40,00 d	13,79 d
Testemunha	15,23 d	40,00 d	13,98 d
C.V (%)	11,29	1,48	4,81

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Corroborando com o verificado para o crescimento médio micelial os menores valores de índice de velocidade de crescimento micelial foram apresentados quando o fungo foi tratado com os extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado. Foi verificado para os demais extratos, exceto para os extratos de louro e orégano, diferença significativa em relação à testemunha.

Milanesi et al., (2009) estudaram o efeito do extrato de louro sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, verificaram que os parâmetros não foram significativos.

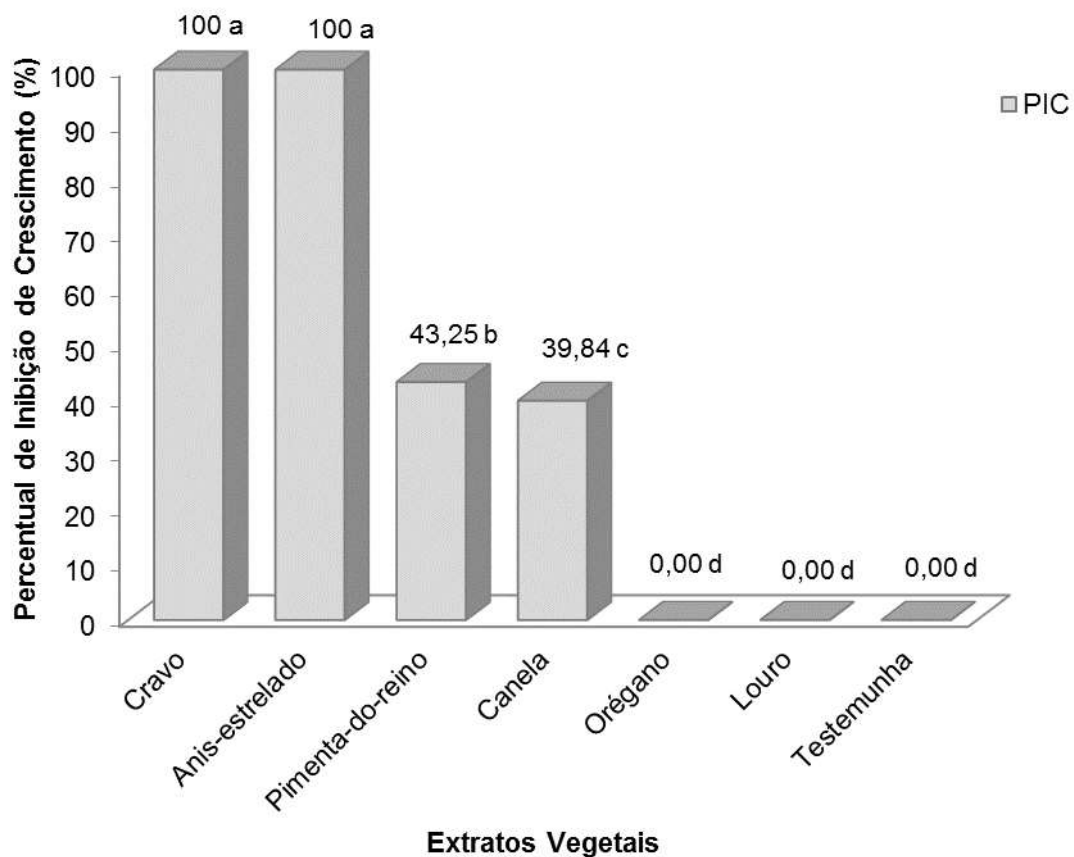
Estudos realizados por Castilho (2015) indicaram que houve controle do crescimento micelial do fungo *L. theobromae*, a partir dos extratos de anis-estrelado, canela e cravo-da-índia na concentração de 20%. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a metade (10%) da concentração desses extratos é eficiente na redução do crescimento médio micelial de *L. theobromae*.

Venturoso et al. (2011) observaram que o extrato de canela reduziu o crescimento micelial de *Fusarium solani*, com o aumento das concentrações usadas (5,10,15 e 20%), verificando-se menor diâmetro da colônia fúngica nas maiores concentrações, mas não houve total inibição sobre do crescimento do patógeno.

É possível perceber que o efeito do extrato vegetal pode apresentar ação variável dependendo da concentração e do patógeno que se deseja realizar o controle.

De acordo com o observado na figura 1, percentuais promissores de inibição de crescimento micelial do fungo *L. theobromae* foram verificados para os extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado com 100% de inibição. Os extratos de pimenta-do-reino e canela apresentaram percentual de 43,25% e 39,84%, respectivamente, também diferindo significativamente da testemunha (0%).

Figura 1. Percentual de Inibição de Crescimento Micelial de *L. theobromae* sob efeito de extratos vegetais.



*Médias seguidas pela mesma letra por variável não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C. V. (%) 2,18. Alta Floresta-MT, 2016.

Não foi verificado efeito significativo de inibição dos extratos de orégano e louro sobre o crescimento do patógeno.

Pesquisas realizadas por Misra et al. (1992), Farooq et al. (2002), Azaz et al. (2002) e Kunle et al. (2003) mostraram que extratos vegetais, após fracionados, tornam-se muito mais eficientes. Evidenciando a necessidade de novos estudos, visando definir

uma metodologia específica de extração e a melhor concentração para que seja possível a sua utilização em larga escala no controle de fungos, como uma alternativa à utilização de produtos químicos.

Os ensaios realizados *in vitro*, demonstraram efeitos potenciais dos extratos utilizados sobre o desenvolvimento micelial de *L. theobromae*, podendo-se inferir que houve ação fungistática em maior percentual dos extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado, seguido dos extratos de pimenta-do-reino e canela, sobre crescimento do fungo em condições controladas.

Conclusões

Verificou-se efeito significativo dos extratos de cravo-da-índia e anis-estrelado, com 100% de inibição do crescimento micelial do fungo *L. theobromae*.

Os extratos de pimenta-do-reino e canela diferiram significativamente da testemunha.

Para os extratos de orégano e louro não foi verificado efeito significativo sobre o crescimento do fitopatógeno, em condições *in vitro*.

Referências bibliográficas

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p.265-267, 1925.

AZAZ, D. et al. Antimicrobial activity of some *Satureja essential* oils. **Zeitschrift für Naturforschung**, Balikesir, v. 57, n.1, p. 817-821, 2002.

BURGESS, T. I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M. E. C.; GOMES, J. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Oxford, v. 42, n.3, p. 225 – 226, 1939.

CASTILHO, A. N. **Controle alternativo de *Lasiodiplodia theobromae* com extratos vegetais**. 2015, p. 36. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) Universidade do Estado de Mato Grosso. Alta Floresta, 2015.



FAROOQ, A. et al. Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Journal Biosciences**. Karachi, v. 57, p. 863- 866, 2002.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**. New York, v. 84, n. 3, p. 277-288, 1992.

KUHN, R. A.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R. Uso da biomassa cítrica no controle de doenças da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.8, n.1-2, p.85-98, 2009.

KUNLE, O., J. OKOGUN, E. EGAMANA, E. EMOJEVWE & M. Shok. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, Abuja, v. 10, n.1, p. 59-61, 2003.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 1-14, 2001.

MILANESI, P, M, et al. Fungitoxic Action of Plant Extracts on the Mycelial Growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.16, n. 1, p.13, 2009.

MISRA, T. R. S. et al. Antifungal essential oil and a long chain alcohol from *Achyranthes aspera*. **Journal Phytochemistry**, Gorakhpur, v. 31, n. 5, p. 1811-1812, 1992.

OLIVEIRA LINS, S.R.; ALVES, E.; OLIVEIRA, S. M. A. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira caracterização morfológica de isolados do patógeno. **Acta Microscopica**, Caracas, v.19, n.3, p.221-231, 2010.

POTENZA, M. R. Produtos Naturais para o Controle de Pragas. X Reunião itinerante de fitossanidade do Instituto Biológico – Café. 2004. Mococa. Anais ... Mococa: Instituto Biológico. 2004, 101p. Disponível em: <<http://www.biológico.sp.gov.br/rifib/X%20RIFIB%20anais.pdf>> Acesso em: 09 setembro 2016.



RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A. **Manejo de Doenças Fúngicas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2000.

SILVA, I. D. et al. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog), sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 35, n. 2, p. 102- 115, 2005.

VENTUROSOSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologia**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, Poznan, v.9, n 2, p.151-159, 1992.