

**CONTROLE ALTERNATIVO “IN VITRO” DE
SCLEROTIUM ROLFSII EM GIRASSOL
(*HELIANTHUS ANNUUS* L.) PELO USO DE
EXTRATOS VEGETAIS E *TRICHODERMA* SPP**

Jackson de Lima Araújo¹
Erivanda Silva de Oliveira²
Francisca Nívia Teixeira³

RESUMO – Dentre os patógenos que atacam a cultura do girassol os fungos são considerados maioria, destacando-se o *Sclerotium rolfsii* Sacc, agente causal da podridão do colo, tida como uma das principais doenças em todas as regiões do cultivo. Com objetivo de avaliar a eficiência de diferentes isolados de *Trichoderma* spp e de extratos vegetais de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham), Alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.) e Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc “*in vitro*” foi realizado o presente trabalho. A atividade antagônica de *Trichoderma* spp sobre *S. rolfsii* foi realizada pelo método de culturas pareadas e posteriormente determinada à capacidade de sobrevivência. Na atividade de extratos vegetais sobre *S. rolfsii* foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 15 e 20%, distribuídas em placas de Petri em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições e incubados em temperatura de (28°C ± 2°C) e fotoperíodo de 12 h por 7 dias. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos isolados de *Trichoderma* spp mostraram-se eficientes na inibição de *S. rolfsii*, demonstrando diferentes mecanismos de antagonismo. Na avaliação dos extratos vegetais, Alecrim pimenta foi o mais promissor para o controle do patógeno nas concentrações de 15 e 20%.

Palavras-chave: Agentes antagonistas. Extratos vegetais. Doenças. Girassol.

¹ Engenheiro agrônomo, estudante de mestrado/Departamento de Solos, Universidade Federal do Ceará, CEP 60.356-001 Fortaleza-CE.

jacksonlima@agronomo.eng.br.

² Engenheira agrônoma, mestra, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

erivandadeoliveira@hotmail.com

³ Engenheira agrônoma, mestra, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

1 INTRODUÇÃO

Entre as oleaginosas cultivadas no mundo, o girassol (*Helianthus annuus* L.) ocupa a quinta posição em área plantada: são 23 milhões de hectares. O mercado no Brasil já há algum tempo está mais aquecido, face a demanda por óleo de girassol, que cresce 13 % ao ano em razão não apenas do crescimento do mercado de óleo e o uso na alimentação animal, mas principalmente por representar uma nova alternativa de mercado na produção de matéria-prima para obtenção de biocombustíveis (EMBRAPA, 2011).

Na cultura do girassol, como acontece em outras culturas, quaisquer interferências dos fatores bióticos ou abióticos refletem na população final de plantas e perdas na produção. Dentre os agentes bióticos, as pragas e as doenças são os principais fatores que causam redução na produtividade desta cultura em regiões tradicionais de cultivo (MOREIRA *et al.*, 2009).

Dentre as doenças que atacam o girassol, a maioria é considerada de origem fúngica. Moreira *et al.* (2009), avaliando a infestação fúngica em diferentes genótipos de girassol cultivados no estado do Rio Grande do Norte, constatou que a septoriose, mancha de alternaria e a podridão do colo foram as mais expressivas e merecem especial atenção quanto à suscetibilidade a estas doenças nas condições dos tabuleiros costeiros do estado.

O patógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc. encontra-se amplamente distribuído em regiões de clima tropical e subtropical, em locais onde ocorrem temperaturas altas e umidade seguida de períodos de seca, ocasionando podridões da raiz e base do colo e tombamento. Esse patógeno afeta um grande número de hospedeiros em diversos gêneros de plantas cultivadas e silvestres (BIANCHINI *et al.*, 2005).

Segundo Mendes (2013), a doença pode ser encontrada nas diversas espécies e famílias, como no pimentão, amendoim, soja, milho, arroz, trigo, cevada, girassol, alface, couve-flor, cebola, quiabo, alho, anacardiáceas, diversas cucurbitáceas e muitos outros hospedeiros.

O controle de doenças envolve medidas que geralmente aumentam os custos de produção e a conseqüente redução do lucro da

atividade agrícola, ameaçando a sustentabilidade econômica e ecológica. Estes fatores têm motivado a busca por métodos alternativos de controle que substituam ou diminuam o uso indiscriminado de defensivos. Dentre esses métodos alternativos, o uso de subprodutos de plantas medicinais pode ser uma alternativa viável, seja do ponto de vista econômico, seja do ponto de vista ambiental (RODRIGUES *et al.*, 2006). Também esta forma de controle é interessante aos produtores rurais pela facilidade de acesso às plantas medicinais, normalmente cultivadas nas pequenas propriedades agrícolas (CUNICO *et al.*, 2006).

Considerando a importância do uso desses métodos, as vantagens socioeconômicas, bem-estar social e manutenção do equilíbrio dos agroecossistemas de importância fundamental na agricultura sustentável, foi realizado o presente trabalho objetivando avaliar a eficiência do antagonista *Trichoderma* spp e extratos vegetais no controle de *Sclerotium rolfsii* “*in vitro*”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios visando à seleção de métodos alternativos para o controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc em girassol foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), durante os meses de maio a novembro de 2011, tendo-se avaliado a atividade fungitóxica de extratos vegetais e isolados de *Trichoderma* spp como agentes antagonistas.

No trabalho foi utilizado um isolado de *Sclerotium rolfsii* Sacc de uma colônia pura, previamente isolada e repicada do girassol e de quatro estirpes de *Trichoderma* spp isoladas de diferentes culturas. Patógeno e antagonistas obtidos na micoteca do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes foram cultivados em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) dentro de tubos de ensaio e mantidos em temperatura de (28°C ± 2°C) e fotoperíodo de 12h.

A avaliação da atividade antagônica de *Trichoderma* spp sobre *S. rolfsii* foi realizada pelo método de culturas pareadas para determinação da velocidade de crescimento e habilidade competitiva, determinando-

Ciências Agrárias

se posteriormente a capacidade de sobrevivência do patógeno após pareamento com antagonista.

Foram utilizados quatro isolados de *Trichoderma* spp designados respectivamente T25 (*Trichoderma arxianum*), TC (*Trichoderma* do coqueiro), TA (*Trichoderma* do Amaris) e TF (*Trichoderma* do feijão), provenientes da micoteca do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes da UFC.

Discos de micélio de *S. rolfssii* e de *Trichoderma* spp com aproximadamente 5 mm de diâmetro foram transferidos para as placas de Petri contendo meio BDA disposto em lados opostos e distanciados de 7 cm. Discos de micélio de *S. rolfssii* pareados com discos de Agar-água serviram de testemunha. As placas foram incubadas a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 14 dias. O potencial de controle do *Trichoderma* spp sobre o *S. rolfssii* foi determinado aos sete dias através de medições do crescimento linear das colônias do patógeno e antagonista, calculando-se os valores médios de porcentagem de inibição, em relação à testemunha.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições cada, sendo os resultados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade.

A sobrevivência de *S. rolfssii* Sacc frente aos diferentes isolados de *Trichoderma* spp foi avaliada aos 14 dias após a incubação pela transferência de discos de 5 mm de diâmetro removidos da área de interação entre o patógeno e o antagonista para placas contendo meio BDA (dois discos por placa), num total de cinco repetições. Os resultados foram expressos em termos percentuais, considerando o crescimento de *S. rolfssii* em cada placa/tratamento.

Os extratos vegetais foram obtidos utilizando-se de 200 g de folhas e inflorescência de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e de alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.), procedentes da área de agricultura natural do Laboratório de Tecnologia de Análise e Sementes da UFC, e 200 g de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) adquirido no mercado local.

Os materiais vegetais passaram por um processo de limpeza com lavagem em água corrente, visando à redução da carga de insetos disseminados na superfície, na sequência desinfestado em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1,5% seguida de tríplice lavagem em água destilada. Após esse procedimento foram triturados em um liquidificador com 1000 mL de água destilada esterilizada, coados em gaze tripla e armazenados em frascos escuros, vedados e protegidos da luz sob refrigeração de 6°C até a montagem do experimento.

Os tratamentos foram obtidos pela adição de alíquotas de cada extrato em meio BDA fundente ($\pm 60^\circ\text{C}$) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20%, distribuídas em placas de Petri de 80 mm de diâmetro (20 mL/placa). Discos de BDA com 5,0 mm de diâmetro, contendo estruturas do patógeno (micélio), foram transferidos para o centro das placas, em seguida vedados com parafilme e incubados a ($28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 h durante 7 dias.

Para a determinação do crescimento micelial utilizou-se uma régua milimétrica com medições em sentidos diametralmente opostos, em duas avaliações, aos quatro e sete dias após o plaqueamento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo que cada placa representou uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo o percentual de inibição calculado pela fórmula: $\% \text{ INIBIÇÃO} = 100 \times (\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) / \text{Crescimento da testemunha}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp no controle de *S. rolfsii* estão representados na Tabela 1. De acordo com as avaliações realizadas aos 4 dias de incubação, todos os isolados mostraram-se bastante promissores na redução do crescimento micelial do patógeno, com inibição variando de 48,6 a 57,9 % em relação à testemunha, conforme comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 1 - Percentual de inibição (%) de *S. rolfsii* frente ao antagonismo de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Inibição do crescimento 4 dias (%)
<i>S. rolfsii</i>	0,00 ^a
<i>S. rolfsii</i> x T25	48,66 ^b
<i>S. rolfsii</i> x TA	51,89 ^{bc}
<i>S. rolfsii</i> x TF	55,77 ^{bc}
<i>S. rolfsii</i> x TC	57,99 ^c

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora as avaliações apontem o TC como o mais eficiente na redução de crescimento do patógeno, observações realizadas até o término da avaliação ocorrida aos 14 dias demonstram que todos estes não apresentam diferenças estatisticamente significativa na inibição. As observações mostraram que todos os isolados continuaram crescendo sobre o meio, avançando sobre a colônia do patógeno, que teve seu crescimento paralisado ao se encontrarem. A confirmação veio pela formação de uma zona de demarcação entre as duas colônias.

A efetividade do gênero *Trichoderma* no controle biológico tem sido confirmada em diversos trabalhos realizados com os mais variados patógenos. Resultados satisfatórios foram obtidos por Costa (2003) com isolados de *Trichoderma* spp no controle de *Phytophthora* spp “*in vitro*”. Percentual de inibição de 55% em *Lasiodiplodia theobromae* foi observado por Cruz (2007). Oliveira (2009) obteve inibição de 84% ao parear isolados de *Trichoderma* spp com *Colletotrichum musae*. Macedo *et al.* (2007), avaliando a influência de 12 isolados de *Trichoderma* spp pertencentes à coleção de fungos fitopatogênicos da EMBRAPA sobre o crescimento *in vitro* de *S. rolfsii*, concluíram que todos foram eficientes, com inibição de 75 e 100%.

Além da habilidade competitiva demonstrada pela maior velocidade de crescimento e da capacidade parasitária constatada pela so-

breposição da colônia do patógeno, verificou-se o completo controle e morte do patógeno, quando da realização dos testes de sobrevivência realizados aos 14 dias após o pareamento, comprovando a ação fungicida de todos os antagonistas (Tabela 2) sobre *S. rolfsii*, sendo que somente isolados de *Trichoderma* spp se desenvolveram.

Tabela 2 - Percentual de sobrevivência de *S. rolfsii*.

Tratamentos	Sobrevivência (%)
<i>S.rolfsii</i> x T25	0
<i>S. rolfsii</i> x Ta	0
<i>S. rolfsii</i> x Tf	0
<i>S. rolfsii</i> x Tc	0

Os dados em percentuais de inibição sobre *S. rolfsii* “*in vitro*” frente à ação de extratos vegetais estão representados na Tabela 3. Diferenças significativas foram vistas entre os tratamentos com inibições variando de 16,44 a 100% em comparação com a testemunha. Os dados obtidos indicaram que o extrato de alecrim pimenta foi o mais efetivo, com inibição de 100% do crescimento micelial do patógeno nas concentrações de 15 e 20%. Nos demais tratamentos realizados com extratos de gengibre e alfavaca cravo, foram vistos resultados satisfatórios nas concentrações de 20%, com inibição de 57,08 e 66,88 %, respectivamente.

A constatação da inibição do crescimento micelial de diferentes patógenos utilizando alecrim pimenta, foi observado por diversos pesquisadores em trabalhos realizados *in vitro*.

Cruz (2007) e Oliveira (2009) utilizando extratos hidroalcoólicos obtiveram inibição de 100% de *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente em todas as concentrações que variaram de 5 a 30 %.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2010) a partir das concentrações de 10% quando utilizou extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta na inibição de *Fusarium pallidoroseum*.

Ciências Agrárias

Para alfavaca cravo os resultados obtidos no presente estudo divergiram dos obtidos por Benini *et al* (2010) quando avaliaram o efeito de óleo essencial e extrato bruto de alfavaca cravo *in vitro* na inibição de fungos fitopatogênicos dentre eles *S. rolfsii* com inibição de 100 % em todas as concentrações. Estas divergências podem ser atribuídas a diferentes fatores, entre eles a idade da planta, época de colheita, estágio de maturação, condições climáticas.

Tabela 3 - Percentagem de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* em diferentes concentrações dos extratos vegetais.

Tratamentos	Concentrações (%)				
	0	5	10	15	20
Alfavaca cravo		19,99 ^{bc}	16,44 ^{ab}	20,88 ^{bcd}	66,88 ^f
Alecrim pimenta		19,32 ^{abc}	56,21 ^{cde}	100 ^g	100 ^g
Gengibre		40,68 ^{de}	37,77 ^{cde}	28,88 ^{bcd}	57,08 ^{ef}
Testemunha	0,00 ^a				
CV (%)	20,73				

*Médias seguidas da mesma letra na tabela, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Trichoderma* spp mostraram-se eficientes na inibição de *S. rolfsii*, demonstrando diferentes mecanismos de antagonismos.

O extrato vegetal de alecrim pimenta foi efetivo no controle de *S. rolfsii* nas concentrações de 15 e 20%.

ALTERNATIVE CONTROL "IN VITRO" OF *SCLEROTIUM ROLFSSII* ON SUNFLOWER (*HELLANTHUS ANNUUS L.*) BY THE USE OF PLANT EXTRACTS AND *TRICHODERMA SPP*

ABSTRACT- Among the pathogens that attack sunflower cultivation most fungi are considered, highlighting the *Sclerotium rolfsii* Sacc causal agent of stem rot seen as a major disease in all regions of cultivation. In order to evaluate the efficiency of different isolates of *Trichoderma spp* and plant extracts of Rosemary Pepper (*Lippia sidoides* Cham), clove Basil (*Ocimum gratissimum L.*) and Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. "in vitro" was carried out this work. The antagonistic activity of *Trichoderma spp* on *S. rolfsii* was carried out by the method of dual cultures and subsequently determined the ability of survival. In the activity of plant extracts on *S. rolfsii* were used concentrations of 5, 10, 15, and 20% distributed in Petri dishes of in completely randomized design in five replications and incubated in temperature ($25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$) and photoperiod of 12 h for 7 days. Means were compared by Tukey test at 5% probability. All isolates of *Trichoderma* species were effective in inhibiting *S. rolfsii*, showing different mechanisms of antagonism. In the assessment of plant extracts Rosemary pepper was the most promising for the control of pathogen at 15 and 20% concentrations.

Keywords: Agents antagonists. Plant extracts. Diseases of sunflower.

REFERÊNCIAS

BENINI, P. C. *et al.* Efeito in vitro do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro extrações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.677-683, outubro/dezembro, 2010.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed., vol. 2, p. 344-345. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

Ciências Agrárias

COSTA, M. H. D. **Utilização de extratos de *Lippia* spp. e de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Pytophthora* spp. “in vitro”**. 2003. 40f. Monografia (graduação em agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CUNICO, M. M. et al. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miqu., Piperaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.7, p. 15-24, 2006.

CRUZ, T. M. L. **Utilização de extratos vegetais e microrganismos antagonistas no controle in vitro de *Lasiodiplodia theobromae***. 2007. 51f. Monografia (graduação em agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

EMBRAPA. **Em debate o plantio do girassol no Brasil**. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/1999/outubro/bn.2004-11.25.3614877052/>. > Acesso em: 20/10/2011.

LIMA, I. B. **Uso de extratos vegetais no controle de *fusarium pallidoroseum* em frutos de melão**. 2010. 53f. Monografia (graduação em agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MACEDO, et al. Influencia de *Trichoderma spp*, sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 213**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>>. Acesso em: 19/03/2013.

MOREIRA, M. A. B.; LIRA, M. A.; ALVES, M. C. S.; TALAMINI, V. Ocorrências de doenças fúngicas na cultura do girassol no Rio Grande do Norte. **Comunicado Técnico**, ISSN 1678-1937, Aracaju, Dezembro, 2009.

OLIVEIRA, E. S. **Extratos e óleos essenciais vegetais, microrganismos antagonistas, indutores de resistência e produtos antisépticos no controle da antracnose em banana.** 2009. 50f. Monografia (graduação em agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n.1, p. 123-127, 2006.