

Queima Foliar e Tombamento de Mudanças em Plantas Medicinais Causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B

Reginaldo G. Mafia¹, Acelino C. Alfenas¹, Luiz A. Maffia¹, Gizella M. Ventura², Eraclides M. Ferreira¹, Irislei F. Neves¹, Cláudia A. Vanetti¹ & Clarice Silva³

¹Departamento de Fitopatologia; ²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, e-mail: aalfenas@ufv.br; ³Millefolium S.A., Viçosa, MG

(Aceito para publicação em 01/10/2004)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., VENTURA, G.M., FERREIRA, E.M., NEVES, I.F., VANETTI, C.A. & SILVA, C. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B. Fitopatologia Brasileira 30:302-306. 2005.

RESUMO

Recentemente, em plantas medicinais da família Labiatae (*Rosmarinus officinalis*, *Lavandula* sp., *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*), constatou-se tombamento de mudas em pós-emergência e queima foliar ascendente. Em isolamentos efetuados a partir de tecidos doentes, observou-se o desenvolvimento de um fungo com hifas ramificadas em ângulo de aproximadamente 90°, constrição na base da ramificação, septo próximo à inserção da hifa lateral e outras características típicas do gênero *Rhizoctonia*. Inoculou-se o fungo em plantas sadias cultivadas em vasos plásticos. Naquelas inoculadas por pincelamento de inóculo, ocorreu queima foliar de forma generalizada aos quatro dias da inoculação, enquanto nas inoculadas pela deposição de inóculo na superfície dos vasos, houve queima foliar ascendente, como observado em condições naturais, aos dez dias da inoculação. Com base na morfologia da colônia, crescimento micelial, número de núcleos, identificação do grupo e subgrupo de anastomose e da fase teleomórfica, o patógeno foi caracterizado como *Rhizoctonia solani* (fase anamórfica de *Thanatephorus cucumeris*). Com a reprodução dos sintomas da doença por inoculação artificial nas mudas e o reisolamento, em meio de batata dextrose ágar (BDA), do mesmo fungo a partir de tecidos doentes confirmou-se *R. solani* como o agente etiológico da doença.

Palavras-chave adicionais: medicinal, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula* sp., *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

Leaf blight and seedling damping-off of medicinal plants caused by *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B

Recently, seedling damping off and blight progressing from old to young leaves were found on medicinal plants of the family Labiatae (*Rosmarinus officinalis*, *Lavandula* sp., *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris*). A fungus was isolated from diseased tissues, in which the hyphae had diameter, ramification angle of about 90°, basal constriction, a septum next to the lateral hyphae, and other typical characteristics of the genus *Rhizoctonia*. The fungus was inoculated on healthy plants cultivated in plastic pots by brushing inoculum suspension on leaves (brushing) or by pouring the inoculum suspension on the surface of pots (soil infestation). On plants inoculated by brushing, disease symptoms occurred on all leaves four days after inoculation. On plants inoculated by soil infestation, leaf blight continued to ascent for ten days after inoculation under natural conditions. Based on colony morphology, mycelial growth, number of nuclei, identification of anastomosis group and subgroup, and on the teleomorph, the pathogen was considered to be *Rhizoctonia solani* (anamorph of *Thanatephorus cucumeris*). As disease symptoms were reproduced by artificial inoculation on plants and the fungus was reisolated on potato dextrose agar (PDA) from diseased tissues, *R. solani* was confirmed to be the causal agent of the disease.

Additional keywords: medicinal plants, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula* sp., *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*.

Uma planta medicinal pode ser definida como qualquer vegetal que produza, em quantidade considerável, substâncias biologicamente ativas utilizadas direta ou indiretamente como medicamentos (Castro & Ferreira, 2000; Castro *et al.*, 2001), ou que contenha um ou mais princípio(s) ativo(s) que lhe confere(m) atividade terapêutica (Martins *et al.*, 2000).

O uso de plantas medicinais está em franca expansão em todo o mundo, inclusive no Brasil. A título de exemplo, o mercado mundial de fitoterápicos movimentava anualmente um montante de 20 a 40 bilhões de dólares (Perecin, 2001), e, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial utilizam principalmente as

medicinas tradicionais para suprir as necessidades de assistência médica primária (Ming, 1994).

Com o interesse crescente sobre a eficiência dos princípios ativos, nos últimos anos, ocorreu incremento significativo no cultivo comercial de plantas medicinais. Paralelamente, o aumento em área cultivada pode ter levado ao incremento na possibilidade de ocorrência de doenças, apesar de, normalmente, existir um nível de resistência natural nestas plantas (Martins *et al.*, 2000). Neste sentido, recentemente, em alguns espécimes de plantas medicinais da família Labiatae, cultivadas comercialmente na região da Zona da Mata-MG, observou-se o tombamento de mudas

em pós-emergência e uma queima foliar ascendente. Diante desses fatos, o presente trabalho objetivou identificar o agente causal da doença, realizar sua caracterização e sugerir possíveis medidas de controle.

Caracterização das espécies hospedeiras

A doença foi constatada em plantas pertencentes a quatro espécies (Figuras 1 A, B, C e D), caracterizadas como:

i- *Rosmarinus officinalis* L., com nomes comuns: alecrim, alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarino, libanotis e rosmarino. A espécie é originária do Sul da Europa e do Norte da África. A planta é um subarbusto ramificado com até 2 m de altura; folhas sésseis, opostas e lineares, de sabor picante; flores diminutas, azuladas ou brancas, bilabiadas em cimeiras. A planta exala forte aroma, e o óleo essencial contém pineno, canfeno, borneol, cineol, apresenta ainda tanino, alcalóides, saponinas, flavonóides e o ácido rosmarínico (Martins *et al.*, 2000).

ii- *Lavandula* sp., com nomes comuns: alfavaca e lavanda. A espécie é originária da Europa (regiões montanhosas dos países mediterrâneos). A planta é herbácea com caule estirado (comprido esgalhado); folhas sésseis, em forma de espada (ensiformes); inflorescência em espiga interrompida, de coloração azulada e cujo óleo essencial contém geraniol, furfurool, linalol, cariofileno, acetato de linalino e cumarinas (Martins *et al.*, 2000).

iii- *Salvia officinalis* L., com nomes comuns: sálvia, salva-das-boticas, salva e sábia. A espécie é originária do sul da Europa. A planta é um arbusto pequeno, lenhoso de 30 a 50 cm de altura, aromático; folhas alongadas e arredondadas nos caules, que são recobertos por pêlos finos e macios; flores azul-violáceas, formando cachos. Possui sabor amargo e odor forte, cujo óleo essencial contém cineol, cânfora, borneol, tuiona e outros terpenos. Contém ainda ácido ursólico e taninos (Martins *et al.*, 2000).

iv- *Thymus vulgaris* L., com nomes comuns: tomilho e timo. A espécie é originária da Europa. A planta tem haste lenhosa na base e herbácea na ponta, cujos ramos são eretos, aveludados e de cor branca, folhas verde-acinzentadas e pontilhadas na face superior e flores róseas ou brancas. O óleo essencial desta espécie contém timol, carvacrol, cimol, borneol, linalol, cimeno e pineno, além de taninos (Martins *et al.*, 2000).

Caracterização da doença e do patógeno

Os sintomas da doença são caracterizados pela queima foliar ascendente, seguida de morte das porções terminais dos ramos, com desfolha das plantas mais severamente afetadas. Pode também ocorrer tombamento de mudas, especialmente quando se utiliza solo arenoso como substrato. Em observações realizadas nas plantas medicinais, em diferentes estádios de desenvolvimento da doença, evidenciou-se o crescimento epifítico de micélio fúngico sobre a superfície foliar (Figura 1 E). Prepararam-se lâminas por microcultura, nas quais se observou o desenvolvimento de hifas com

diâmetro, ramificação e outras características típicas do gênero *Rhizoctonia*, incluindo ramificação em ângulo de aproximadamente 90°, constrição na base da ramificação e septo próximo à inserção da hifa lateral.

Comprovação do agente etiológico da doença

Diante do quadro sintomatológico nas plantas doentes, realizou-se o isolamento do fungo, de forma direta, por meio da transferência de segmentos de hifas para meio de batata-dextrose-água (BDA). Após incubação a 27 °C, no escuro, por 48 h, os isolados obtidos foram repicados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo inclinado e armazenados a 10 °C. Para comprovar a patogenicidade, três discos de cultivo em BDA foram retirados da borda de colônias em franco crescimento e transferidos para Erlenmeyers contendo meio de cultivo líquido semi-sintético (Alfenas *et al.*, 1998). Após incubação a 27 °C, no escuro, por cinco dias, a massa micelial foi separada do meio de cultura, por filtração a vácuo. Após remoção do excesso de água por prensagem manual em papel de filtro, o micélio foi triturado em Polytron (Brinkmam Instruments®), velocidade 3, por 30 s em volume de água estéril compatível com a concentração de inóculo desejada em cada metodologia de inoculação.

As inoculações foram realizadas por meio de duas técnicas. Na primeira, a superfície dos vasos nos quais as plantas estavam sendo cultivadas em solo orgânico estéril, foi recoberta com, aproximadamente, 2 cm de vermiculita, previamente umedecida (100% p/p) e infestada com micélio, na proporção de 20 mg/g de vermiculita (base seca). Na segunda técnica, a superfície dos ramos das quatro espécies de plantas medicinais foi pincelada com uma suspensão de inóculo, constituída de micélio triturado na concentração de 50 mg/ml de água estéril. As plantas inoculadas pelas duas técnicas descritas foram mantidas em câmara de nevoeiro e, após 48 h, transferidas para casa de vegetação.

Em plantas inoculadas por pincelamento de inóculo, ocorreu queima foliar de forma generalizada após quatro dias da inoculação, enquanto nas inoculadas pela deposição de inóculo na superfície dos vasos, evidenciou-se a sintomatologia de queima foliar ascendente, como observado em condições naturais, após dez dias da inoculação. Em vista da reprodução dos sintomas da doença por inoculação artificial nas mudas e do reisolamento do mesmo fungo para BDA, a partir de tecidos infectados, confirmou-se o agente etiológico da doença como *Rhizoctonia* sp.

A identificação e caracterização de isolados de *Rhizoctonia* sp. não possuem valor meramente descritivo, pois diferenças taxonômicas entre grupos e subgrupos são frequentemente associadas a diferentes comportamentos ecológicos e epidemiológicos (Ogoshi, 1987) e podem influenciar no controle do patógeno (Kataria & Gissi, 1996). Neste sentido, em uma segunda etapa, com vistas à identificação do patógeno ao nível de espécie, caracterizaram-se os isolados quanto à morfologia da colônia, crescimento micelial, número de núcleos e identificação do grupo e sub-grupo de anastomose. Após indução da fase sexuada, caracterizaram-se os teleomorfos

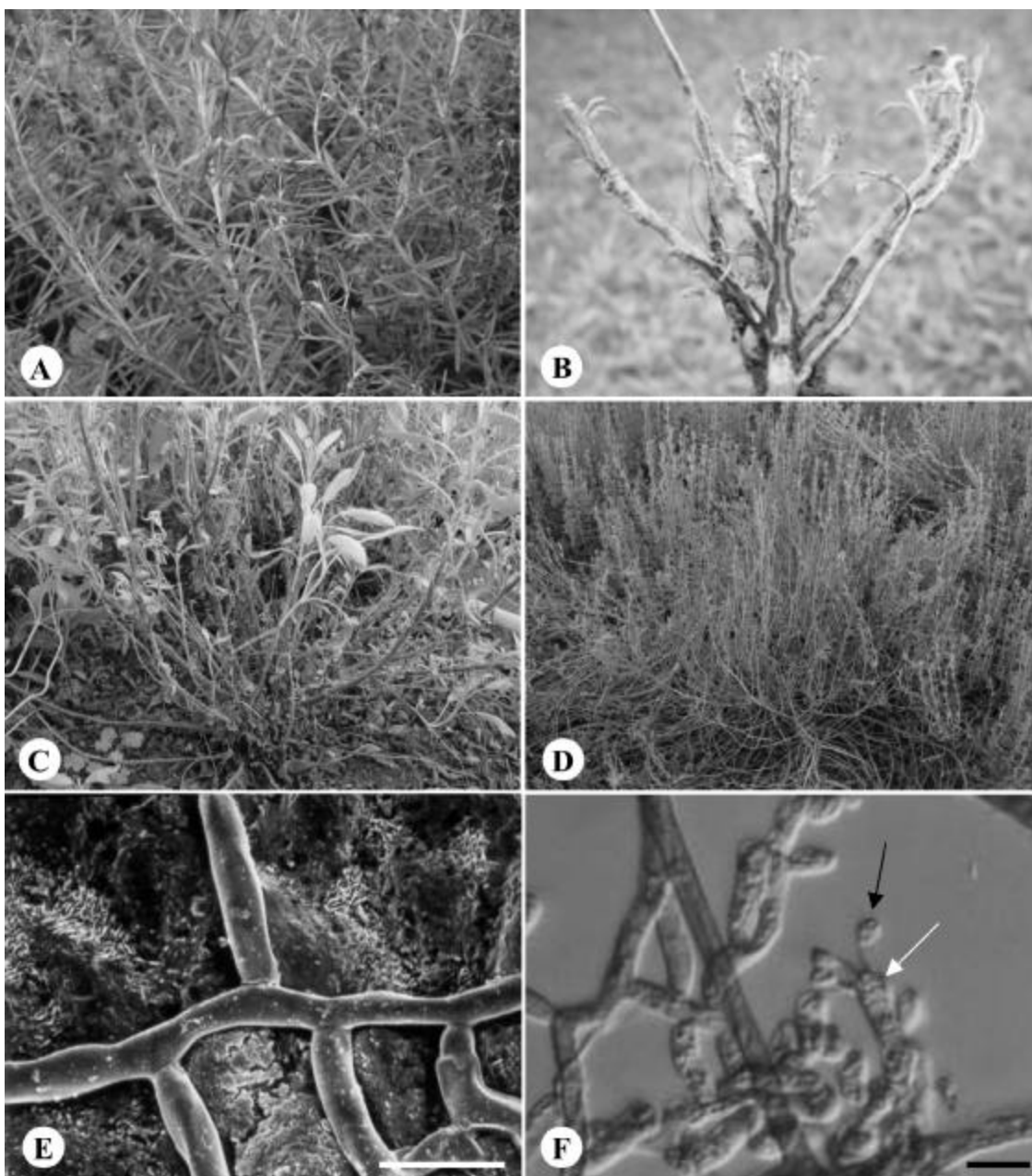


FIG. 1 - Sintomas e sinais da queima foliar causada por *Rhizoctonia solani* em plantas medicinais: A, B, C e D- Queima foliar ascendente em alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alfazema (*Lavandula* sp.), sálvia (*Salvia officinalis*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), respectivamente; E- Crescimento micelial epifítico de *R. solani* sobre a superfície foliar; F- Basídio (seta branca) e basidiósporos (seta preta) de *Thanatephorus cucumeris* (fase sexuada de *R. solani*). Barras = 20 μ m.

quanto às dimensões do metabasídio, dos esterigmas e dos basidiósporos.

Caracterização do patógeno

Para proceder à caracterização morfológica, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo 12 ml de meio BDA, V8® ou aveia-água (aveia a 5%), e mantidos a 27 °C, no escuro. Após 15 dias de incubação, anotaram-se a aparência das colônias, formação de anéis concêntricos, pigmentação,

presença, tamanho e aparência dos escleródios (Sanfuentes, 2000).

Todos os isolados obtidos, quando repicados e cultivados em meios BDA, V8® e aveia água, foram similares quanto ao aspecto da colônia, formação de anéis concêntricos, pigmentação, presença, tamanho e aparência dos escleródios.

Em meio BDA, as colônias apresentaram coloração bege com halos concêntricos e escleródios claros de aspecto farináceo em formação. Em meio de aveia água, ocorreu

formação de micélio superficial abundante em colônias de coloração bege clara e sem formação de anéis concêntricos. Nesse meio de cultivo houve produção abundante de escleródios pequenos (± 1 mm de diâmetro) de coloração bege clara quando imaturos, passando a marrom, organizados individualmente ou em crostas-esclerodiais, formados por células monilióides. No meio V8[®], as colônias de coloração marrom a bege clara apresentavam normalmente apenas um anel de crescimento, com formação de escleródios menores (diâmetro inferior a 1 mm) e de coloração marrom.

Para avaliação do crescimento micelial, discos de cultivo (7 mm de diâmetro), obtidos a partir da borda de colônias em franco crescimento, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo 12 ml de meio BDA, as quais foram mantidas a 7, 14, 21, 28, 35 e 42 °C, no escuro. Em intervalos diários, avaliou-se o diâmetro das colônias até que atingissem a periferia das placas.

Observou-se tendência de maior crescimento micelial a 28 °C, evidenciado pelo maior diâmetro médio das colônias e pelas maiores taxas de crescimento médio. Nessa temperatura, a colônia teve, em média, 8,4 cm de diâmetro após 72 h de incubação e, portanto, taxa de crescimento equivalente a 2,8 cm.dia⁻¹. A 7 e 42 °C não ocorreu o crescimento micelial (Figura 2).

Na determinação do número de núcleos, empregou-se o método HCl-Giemsa (Herr, 1979) de coloração de núcleos e a coloração utilizando safranina-O (Bandoni, 1979). O micélio utilizado na primeira técnica foi produzido em meio líquido semi-sintético a 27 °C, no escuro, por 48 h, e em seguida separado do meio de cultura por filtração a vácuo. Na segunda técnica, lâminas de microcultura foram utilizadas para montagem final com o referido corante.

Com base no número de núcleos, as espécies do gênero *Rhizoctonia* podem ser divididas em três grupos, formados por micélio uni, bi ou multinucleado (Carling, 1996). Nas duas técnicas de coloração de núcleos empregadas, todos os isolados estudados foram caracterizados como multinucleados,

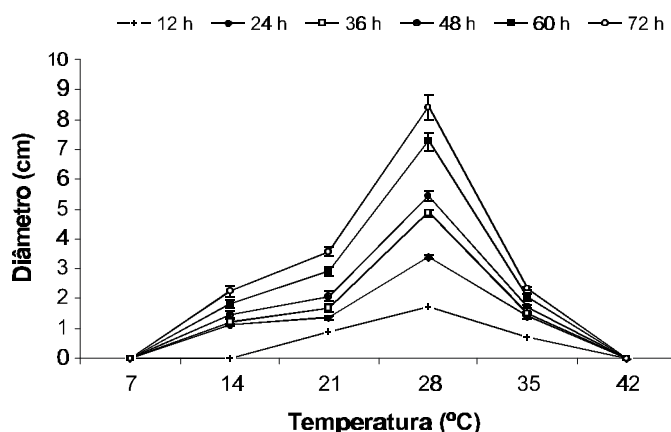


FIG. 2 - Crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* ao longo do tempo e em função de diferentes temperaturas de incubação. As barras verticais representam o erro padrão da média.

com média de nove núcleos por células sendo o mínimo e o máximo de sete e 11 núcleos, respectivamente.

Na identificação do grupo e subgrupo de anastomose, os isolados foram pareados frente aos isolados-testes, empregando-se o método de discos de BDA com micélio em lâminas de microscopia mantidas em câmara úmida. Para comprovação das reações de anastomose, o micélio foi corado com lactofenol, contendo 0,5% de anilina, e visualizado ao microscópio de luz (X 400).

Os isolados obtidos das quatro plantas medicinais, quando pareados com isolados-teste multinucleados, formaram anastomose de hifas com o grupo AG1 e subgrupo 1B. Os grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. podem ser associados a diferentes características culturais, tipo de hospedeiros, dentre outras. Contudo, há ampla variabilidade dentro de cada grupo e, portanto, ainda existe a possibilidade de subdivisão dos grupos de acordo com a gama de hospedeiros, morfologia, requerimentos para tiamina e homologia de DNA (Sneh *et al.*, 1991; Carling, 1996).

Para induzir a fase sexuada do fungo, empregou-se parte das plantas utilizadas no teste de patogenicidade, as quais foram mantidas na câmara de nevoeiro durante 15 dias adicionais. Além disso, ramos de eucalipto, previamente desinfestados superficialmente em hipoclorito de sódio a 1.000 ppm de cloro ativo, foram inoculados por pincelamento, conforme descrito previamente e mantidos nas mesmas condições por igual intervalo de tempo (Silveira, 1996). O himênio formado sob os ramos foi removido cuidadosamente e caracterizado quanto às dimensões do metabasídio, dos esterigmas e dos basidiósporos, com auxílio de um microscópio de luz.

Apenas quando o inóculo foi pincelado sob ramos de eucalipto, houve indução da fase teleomórfica, com a formação de himênio, contendo basídios e basidiósporos. Essa fase foi observada sob as folhas a partir de 12 dias da inoculação e, em geral, nas folhas mais velhas do ramo. As dimensões do metabasídio e basidiósporos foram semelhantes às descritas para *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, normalmente com quatro esterigmas e basidiósporos de 7-10 (-12) x 4-7 μ m (Figura 1 F) (fase perfeita de *R. solani*) (Sneh *et al.*, 1991).

Para a doença em questão, as medidas de controle devem ser fundamentadas em práticas culturais ou em outras medidas que não envolvam o uso de produtos químicos. Esses são condenados no cultivo de espécies medicinais, justificado pela inexistência de produtos registrados, conforme exigência legal, e pelas alterações que tais produtos podem ocasionar nos princípios ativos (Martins *et al.*, 2000). Portanto, recomenda-se realizar a produção de mudas em solo ou substrato isento de inóculo de fitopatógenos e efetuar o plantio definitivo no campo em áreas de histórico conhecido e sabidamente livre do patógeno, entre outras.

No Brasil, este é o primeiro relato da queima foliar ascendente e do tombamento de mudas de alecrim, alfavema, sálvia e tomilho, da caracterização destas doenças e da identificação do seu agente etiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., ALONSO, S.K. & SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 1998. pp.85-114.
- BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71:873-874. 1979.
- CARLING, D.E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh, G., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp.37-47.
- CASTRO, H.G. & FERREIRA, F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*). Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 2000.
- CASTRO, H.G., FERREIRA, F.A., SILVA, D.J.H. & MOSQUIM, P.R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. Visconde do Rio Branco, MG: Editora Suprema. 2001.
- HERR, L.J. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia*-like fungi. *Phytopathology* 69:958-961. 1979.
- KATARIA, H.R. & GISSI, U. Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp.537-547.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C. & DIAS, J.E. Plantas medicinais. Editora UFV. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- MING, L.C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Horticultura Brasileira* 12:3-9. 1994.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* 25:125-143. 1987.
- PERECIN, M.B. Produção e mercado de plantas medicinais, aromáticas e condimentares: perspectivas para o pequeno produtor. Anais, Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural e Biodinâmica, Botucatu, SP. 2001. p.245.
- SANFUENTES VON STOWASSER, E.A. Caracterização de isolados, flutuações populacional e controle biológico de *Rhizoctonia* em jardim clonal de *Eucalyptus*. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- SILVEIRA, S.F. Etiologia e controle da mela de estacas e da queima de folhas de eucalipto, causada por *Rhizoctonia* spp. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- SNEH, B., BURPEE, L. & OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, USA. 1991.