

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**Potencial de controle preventivo da Podridão vermelha
do Sisal na produção de mudas com aplicação de óleos
essenciais e hidrolato de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

RENATA DE LIMA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2021**

**POTENCIAL DE CONTROLE PREVENTIVO DA PODRIDÃO
VERMELHA DO SISAL NA PRODUÇÃO DE MUDAS COM
APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E HIDROLATO DE
Lippia alba (Mill.) N. E. Brown**

RENATA DE LIMA

Licenciada em Ciências Agrárias
Universidade Federal da Paraíba, 2013

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

L732p	<p>Lima, Renata de. Potencial de controle preventivo da podridão vermelha do sisal na produção de mudas com aplicação de óleos essenciais e hidrolato de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown / Renata de Lima, Cruz das Almas, Bahia, 2021. 90f.; il.</p> <p>Orientadora: Franceli da Silva.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias.</p> <p>1.Sisal – Cultivo – Controle biológico. 2.Essências e óleos essenciais – Atividade antifúngica. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.577</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**POTENCIAL DE CONTROLE PREVENTIVO DA PODRIDÃO
VERMELHA DO SISAL NA PRODUÇÃO DE MUDAS COM
APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E HIDROLATO DE
Lippia alba (Mill.) N. E. Brown**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
RENATA DE LIMA**

Realizada em 19 de fevereiro de 2021

Profa. Dra. Franceli da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Presidente da banca e Orientadora)

Prof. Dr. José Alberto Pereira Cardoso
Centro de Investigação da Montanha/CIMO
Examinador Externo

Dra. Maira Christina Marques Fonseca
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG
Examinador Externo

Prof. Dr. Nuno Rodrigues
Instituto Politécnico de Bragança-IPB
Examinador Externo

Prof. Dra. Cintia Armond
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Membro Externo

Ao meu pai Gentil Trajano da Silva, que sempre será meu exemplo de vida. A minha filha Maria Clara Lima de Oliveira, não há palavras capaz de descrever a dor de te perder, nem mesmo o tempo apagará você na minha memória, meu anjo (*in memoriam*).

A meu esposo Leonardo de Oliveira Barbosa pelo amor, companheirismo, carinho, incentivo e compreensão durante toda minha caminhada de forma incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

A minha família Maria Rita de Lima (mãe), Gentil Trajano da Silva (pai), Francisco de Lima, Ivoneide Lima da Fonseca, Renato de Lima, Reginaldo de Lima (irmãos), Ingrid Victória da Fonseca (sobrinha), Luciana da Fonseca Barbosa e Arlen da Fonseca (primos). Agradeço de todo coração pelo incentivo, apoio, amor, confiança e pela “minha ausência” em suas vidas.

A meu esposo Leonardo de Oliveira Barbosa, por esta sempre ao meu lado, superando todas as barreiras, enfrentando todos os obstáculos. Diante de tudo que passamos prevalecemos firmes e fortes. Agradeço a Deus que colocou uma pessoa tão abençoada em minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa no curso de doutorado e apoio financeiro com os recursos de apoio à pós-graduação (PROAP). À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento da infraestrutura de equipamentos dos Laboratórios de Fitoquímica e das casas de vegetação. Ao CNPq, pelo financiamento do projeto Nexus-Integração Caatinga-Sisal (Processo n. 442516/2017-7).

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB pela formação profissional qualificada e a realização dos trabalhos da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Aos docentes por todo ensinamento proporcionado nas disciplinas e no trabalho.

A minha orientadora Dra. Franceli da Silva, a quem tenho muita admiração. Eu sou grata pela orientação, paciência, amizade, ensinamentos, compreensão e acolhimento, principalmente nos dias difíceis. Gratidão por todos esses anos de convivência que serviram para meu crescimento profissional e pessoal. Digo sempre a ti, que es uma pessoa de luz.

A todos do Grupo de Pesquisa em Plantas Aromáticas, Medicinais e Condimentares (GEPLAM), pela colaboração para realização dos trabalhos de pesquisa de minha tese.

Aos meus amigos que conquistei durante a pós-graduação que sempre estiveram comigo dando força, sendo companheiros nos momentos fáceis e difíceis.

A todos meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
REFERENCIAL TEÓRICO	7
ARTIGO 1	
APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown E <i>Ocimum basilicum</i> L. COMO ESTRATÉGIA NO CONTROLE PREVENTIVO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine).....	21
ARTIGO 2	
POTENCIAL DOS HIDROLATOS DE <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown E <i>Ocimum basilicum</i> L. COMO PRODUTO NATURAL NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine).....	49
ARTIGO 3	
USO DE HIDROLATO DE <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown COMO NOVA TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine).....	72

POTENCIAL DE CONTROLE PREVENTIVO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL NA PRODUÇÃO DE MUDAS COM APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E HIDROLATO DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Autor: Renata de Lima

Orientadora: Dra. Franceli da Silva

RESUMO: A podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine). O manejo dessa doença se faz necessário para a sustentabilidade da cultura. Este trabalho teve como objetivos: i) avaliar o efeito da aplicação individual e combinada dos óleos essenciais-OEs de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* sobre *A. welwitschiae* e no controle da podridão vermelha, ii) investigar o efeito dos hidrolatos de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* sob o *A. welwitschiae* e no controle da podridão vermelha e iii) verificar o efeito do hidrolato de *L. alba* na produção e sanidade de mudas de sisal. No artigo 1, as concentrações testadas variaram de 0,25 a 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e 0,06 a 4 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente. A concentração mínima inibitória-CMI foi de 2 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ em ambos. A aplicação de OEs inibiu a germinação de esporos, com destaque para as concentrações 16 e 8 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *L. alba* com inibição de 99 %. Os OEs individuais e combinados reduziram entre 12-30 % o crescimento micelial. O tratamento das mudas de sisal com os OEs reduziu o índice da doença-ID entre 34-82 %. No artigo 2, as concentrações dos hidrolatos foram preparadas com adição de água destilada para obter as concentrações de 90 a 10%. A CMI sob o *A. welwitschiae* foi de 50% e 70% para *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente. Os esporos e o crescimento micelial de *A. welwitschiae* foram inibidos em 100% na concentração de 80% de *L. alba*. As mudas tratadas com hidrolatos na concentração de 70% reduziram 94% o ID. No artigo 3, cento e vinte bulbilhos de sisal permaneceram imersos no hidrolato de *L. alba* nos tempos de 6, 12, 24 e 48h. Após 240 dias, as mudas de sisal tratadas com hidrolato de *L. alba* apresentaram maior altura (25-30 cm), diâmetro do caule (2,8-2,9 mm), n° de folhas (12 folhas), comprimento (25 cm) e largura (4,3 cm) da folha e volume de raiz (19-21 mL) em relação as mudas controle. Além disso, as mudas tratadas apresentaram redução de 70% no ID. Os OEs e hidrolatos possuem potencial para utilização no manejo da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, *Aspergillus welwitschiae*, *Ocimum basilicum*, produção de mudas, índice da doença.

POTENTIAL FOR PREVENTIVE CONTROL OF RED SISAL ROT IN THE PRODUCTION OF SEEDLINGS WITH THE APPLICATION OF ESSENTIAL OILS AND HYDROLATE FROM *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Author: Renata de Lima

Advisor: Dra. Franceli da Silva

ABSTRACT: The bole rot disease caused by the fungus *Aspergillus welwitschiae* is the main phytosanitary problem of sisal crop (*Agave sisalana* Perrine). Scientific studies on this crop in general, and more specifically on bole rot disease, have historically been neglected. This work aimed to: i) elaborate and validate a scale for quantification of sisal bole rot disease, ii) study histological and histochemical aspects of the internal tissues of the stem of sisal plants with symptoms of bole rot disease and iii) select isolates of *Trichoderma* spp. for control of sisal bole rot and to study at the tissue level the interaction *Trichoderma* - *A. welwitschiae* - *A. sisalana*. The scale was elaborated with six levels of severity (0: 0%, 1: $\leq 5\%$, 2: 7-20%, 3: 22-45%, 4: 50 - $\leq 78\%$, 5: 78% of the affected area), being validated by 12 evaluators (with and without training). The proposed scale is easy to use and provides accurate and accurate results (90%), however the evaluators should be trained for the assessments. In the anatomical study, the pathogen was found in the vessel elements and in parenchyma cells. Bole rot disease is present in all the fundamental parenchyma. The cells infected by the pathogen had degraded and unformed cell walls, which indicates that it acts as a necrotrophic fungus. In addition, *A. welwitschiae* also acts as a vascular wilt pathogen that colonizes the xylem vessels. In response to infection, the plant produces some defense mechanisms such as lignification of the cell walls, obliteration of vessel elements and production of phenolic compounds. The isolates of *Trichoderma* spp. inhibited spore germination, mycelium growth and sporulation of *A. welwitschiae* and promoted a significant reduction of the incidence (70-93%) and severity (97%) of the disease in sisal plants. Cross-sectional stem cuttings of plants treated with *Trichoderma* spp. and infected by *A. welwitschiae* demonstrate that the pathogen and disease progression were contained by layers of lignified parenchyma cells. In addition, hyphae, conidiophore and conidia of *Trichoderma* spp. were found in the stem tissues.

Key words: *A. sisalana*, *A. welwitschiae*, Pathometry, Histology, Lignification.

REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura do sisal

O gênero *Agave* conta com aproximadamente 200 espécies espalhadas pelo mundo. Os agaves desenvolveram particularidades, incluindo o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que lhes permite sobreviver em regiões com altas temperaturas e períodos de secas (STEWART, 2015). As plantas desse gênero têm grande importância econômica e social, pois tem sido usada pela população na produção de bebidas, na ornamentação, medicamento e, principalmente na extração de fibra (DEBNATH et al., 2010; STEWART, 2015).

A *Agave sisalana* Perrine conhecida popularmente como sisal é uma espécie monocotiledônea pertencente à família *Asparagaceae* e seu cultivo destaca-se principalmente pela extração das fibras das suas folhas (LIM, 2014; TEWARI et al., 2014). É considerada a principal fibra dura vegetal produzida no mundo e quando beneficiada, são destinadas à indústria de cordoaria (cordas, cordéis, fios, tapetes) (BASU et al., 2012), também são usadas na confecção de artesanatos (ALVES et al., 2005) e como matéria-prima para a indústria de papel e celulose (GUTIÉRREZ et al., 2008).

O Brasil é o principal produtor e exportador de fibra de sisal no mundo desde 1961 e, segundo o levantamento mais recente da FAO, em 2018 a sua produção foi de 80.042 toneladas, correspondendo a 40 % de toda produção mundial (FAOSTAT, 2020). No Brasil, o cultivo do sisal se concentra em área de pequenos agricultores familiares na região semiárida dos Estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, sendo esse último o maior produtor nacional (96% da produção) (IBGE, 2017). Na Bahia, o seu cultivo ocorre em 20 municípios que compõem o chamado Território do Sisal, dentre os quais se destacam, Conceição do Coité e Valente como os maiores produtores. Nesses municípios, o sisal é uma das culturas possíveis e sua cadeia de serviços destaca-se pela geração de emprego e renda para mais de 600 mil pessoas, que estão envolvidas em atividades que vão desde a manutenção das lavouras até a confecção de produtos (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008).

Apesar da sua importância, a cultura do sisal no Brasil é explorada com baixo índice de modernização, capitalização e tecnológico, o que tem contribuído nos últimos anos para um acentuado declínio tanto na área plantada como na produção (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008; FAOSTAT, 2020). Fatores como o baixo aproveitamento da planta (apenas a fibra), a falta de máquinas modernas para a colheita e

beneficiamento da fibra, os longos períodos de estiagem da região e a podridão vermelha do sisal também contribuem para esse declínio (COUTINHO et al., 2006; SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008).

Podridão vermelha do sisal

Apesar da planta de sisal possuir características morfológicas como cutícula espessa nas folhas e células com paredes altamente lignificada nas raízes, que conferem uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, isso não impede que a planta seja afetada por doenças parasitárias capazes de causar sérios prejuízos (MEDINA, 1954; NETO e MARTINS, 2012).

A podridão vermelha causada pelo agente etiológico *Aspergillus welwitschiae* é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (DUARTE et al., 2018). O patógeno pode infectar o sisal nos diferentes estádios de desenvolvimento, desde mudas (rebentos) até plantas no final do ciclo produtivo. Apesar disso, para que ocorra infecção da planta é necessário a presença de lesões que podem ser ocasionadas pelo homem no corte das folhas para desfibramento e durante os tratos culturais (capinas e retiradas de rebentos) (SILVA et al., 2008). Esta doença tem afetado os sisalais nas principais áreas produtoras dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, de forma isolada, desde 1970 e atingiu níveis críticos a partir de 1998 (ALVES et al., 2005; COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008). A incidência da podridão vermelha varia de uma região para outra. Em algumas, não ultrapassa os 5% enquanto outras, pode chegar a 40% (ABREU, 2010; ALVES et al., 2005). Na Bahia, um estudo epidemiológico realizado por Abreu (2010) mostrou que a podridão vermelha estava presente em todos os municípios produtores de sisal estudados.

De acordo com a descrição Coutinho et al. (2006), a podridão vermelha do sisal é caracterizada pelo escurecimento dos tecidos internos do caule e base das folhas e as áreas colonizadas pelos agentes etiológicos da doença variam da coloração cinza escuro a rosa pálido. Em plantas infectadas, ocorre a murcha e o amarelecimento das folhas e nos estágios mais avançados da doença, o caule apodrece totalmente, ocorrendo o tombamento e a morte da planta. Além de causar a morte da planta, as folhas do sisal infectado tornam-

se impróprias para o desfibramento, contribuindo assim, para diminuição da produção de fibra (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Ainda não existem produtos registrados para o controle da podridão vermelha do sisal. Dessa forma o desenvolvimento de estratégias para o controle da podridão vermelha do sisal faz-se imprescindível para o manejo, expansão e sustentabilidade desta cultura no Brasil.

Controle de patógenos com óleo essencial

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos aromáticos produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas e atuam na sua proteção contra fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros (BAKKALI et al., 2008; CHOUHAN et al., 2017). Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs são misturas naturais muito complexas que podem conter de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns apenas traços (BAKKALI et al., 2008). Alguns estudos indicaram que a bioatividade dos OEs é determinada pelos componentes majoritários ou devido a um efeito sinérgico entre os principais compostos e os menores (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; CAROVIC-STANKO et al., 2010).

Recentemente, as investigações sobre os OEs têm atraído muita atenção dos pesquisadores, pois vários segmentos da indústria farmacêutica, alimentícia, higiênica, cosmética e agrícola têm aplicado amplamente os OEs em seus produtos (JALLALI et al., 2014).

No campo agrícola, os OEs chamam a atenção devido as suas propriedades antifúngicas que podem ser aplicadas para o controle de doenças de plantas. Estudos comprovam que os OEs têm demonstrado potencial significativo na redução de doenças e no controle de fungos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (CHEN et al., 2014; FENG e ZHENG, 2007), *Botrytis cinerea* (SOYLU et al., 2010), *Botrytis fabae* e *Uromyces fabae* (OXENHAM et al., 2005), *Rhizoctonia solani* (KHALEDI et al., 2015), *Fusarium oxysporum* (LA TORRE et al., 2015), *Penicillium* sp. (BOUBAKER et al., 2016) e *A. niger* (KUMAR et al., 2017).

Nos últimos anos, o uso combinado de OEs tem sido uma estratégia investigada para aumentar a eficiência de controle agentes fitopatogênicos (*in vitro*) e reduzir doenças de plantas em experimentos conduzidos em casa de vegetação (*in vivo*) (MOUSAVI e RAFTOS, 2012; STURCHIO et al., 2014; VAVALA et al., 2015). Nesse sentido, a depender dos constituintes que compõem os OEs e/ou do microrganismo alvo, a combinação dos OEs podem apresentar diferentes efeitos (sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico) (BASSOLÉ et al., 2010; BASSOLÉ et al., 2011; FU et al., 2007), que podem ou não aumentar a atividade antimicrobiana.

Algumas formulações com OEs estão sendo preparadas e testadas no controle de fitopatógenos. Os OEs de anis (*Pimpinella anisum*), coentro (*Coriandrum sativum*) e cominho preto (*Negilla sativa*) foram formulados e testados contra *Fusarium oxysporum* (Dray podridão da batata), *Alternaria alternata* (podridão negra do tomate), *Penicillium italicum*, *P. digitatum* (podridão azul e verde da laranja, respectivamente), *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta do morango) e *Erwinia carotovora* (podridão mole da batata). Os resultados revelaram que as diferentes formulações inibiram completamente o crescimento da maioria dos microrganismos testados. Além disso, o processo de formulação não prejudicou a atividade antimicrobiana dos OEs em comparação com os OEs original (sem formulação) (ABO-EL-SEOUD et al., 2010). A formulação de OE de tomilho inibiu o crescimento micelial de *Monilinia fructigena in vitro* e proporcionou uma supressão do patógeno de 64 – 72% em frutos de macieira (TANOVIĆ et al., 2013).

Embora exista alguns estudos com utilização de OEs sobre o agente causal da podridão vermelha (BRITO, 2018; CARVALHO, 2017). A aplicação de OE no controle do *A. welwitschiae* é recente, entretanto tem demonstrado resultados promissores na redução da germinação de esporos, crescimento micelial e esporulação em experimentos *in vitro* (BRITO, 2018; CARVALHO, 2017).

Hidrolatos

Os hidrolatos são subprodutos gerados durante o processo de extração de óleos essenciais de plantas aromáticas pelo método de hidrodestilação. De acordo com a descrição de D'Amato et al. (2018), os hidrolatos são constituídos pela água de condensação do processo de destilação e por componentes de óleo polares, oxigenados, que transmitem odores, hidrofílicos e voláteis que formam ligações de hidrogênio com a água. Na literatura é possível encontrar outras denominações para esse subproduto, dentre

os quais estão inclusos: hidrossóis, hidroflorato, resíduo de planta aromática, água aromática, água floral, água aromática essencial (RAJESWARA RAO, 2013).

Embora em quantidades diferentes, o hidrolato e OE pode conter os mesmos componentes principais. Os OEs e hidrolatos de flores de *Cerasus subhirtella* (Miq.) Sok. e *C. serrulata* (Lindl.) apresentaram o benzaldeído como principal componente, estando em 31,2% e 42,1% nos OEs (*C. subhirtella* e *C. serrulata*, respectivamente) e 67,5% e 64,3% nos hidrolatos (*C. subhirtella* e *C. serrulata*, respectivamente) (LEI et al., 2014). De Matos et al. (2015) também encontraram os mesmos constituintes majoritários ao analisarem a composição do OE e hidrolato de *Campomanesia viatoris* LANDRUM, sendo eles, tasmanona (70,50% e 74,73%, OE e hidrolato, respectivamente), flavesona (12,77% e 12,24%, OE e hidrolato, respectivamente) e aglomerona (6,79% e 10,84%, OE e hidrolato, respectivamente). Em outra comparação da composição química, o OE e o hidrolato de *Geum iranicum* Khatamaz também apresentaram o eugenol (83,9% e 65,4%, respectivamente) e mirtenol (2,3% e 9,9%, respectivamente), como componentes principais (SHAHANI et al., 2011).

Uma série de estudos têm evidenciado que assim como os OEs, os hidrolatos possuem atividade comprovada contra fungos fitopatogênicos e podem ser empregues no controle de doença de plantas. O hidrolato de *Satureja hortensi* L. na concentração de 15% inibiu totalmente do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinérea*, *Alternaria citri* e *A. mali* (BOYRAZ e OZCAN, 2005; 2006). A concentração de 30 mg. mL⁻¹ do hidrolato de *Calendula arvensis* inibiu em 100% e 86,6% o *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*, respectivamente. Posteriormente, peras que foram tratadas com hidrolato de *C. arvensis* e reduziram em 100% a podridão causada por *P. expansum* (BELABBES et al., 2017). O hidrolato de *Thymus capitatus* L. foi testado *in vitro* e *in vivo* contra quatro fungos fitopatogênicos (*A. niger*, *A. oryzae*, *P. italicum* e *Fusarium solani*) causadores a deterioração dos frutos de *Citrus sinensis*. *In vitro* foi constatado efeito fungicida sobre *P. italicum*, *F. solani*, *A. oryzae* e *A. niger* na concentração de 0,1, 0,2, 0,2 e 0,5 µg mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, frutos de *C. sinensis* foram inoculados com *P. italicum* e, posteriormente, tratados com o hidrolato. A concentração de 0,2 µg mL⁻¹ foi suficiente para a redução total da infecção em fruto de laranja, causando 100% de inibição do crescimento micelial (TABTI et al., 2014). Em outro experimento, Tabet Zatlá et al. (2017) reduziram em 70% a infecção de frutos de morango por *Botrytis cinerea* com a utilização de hidrolato (0,1 mL.L⁻¹) de *Daucus carota* subsp. *sativus*. Frutos de maçã

foram tratados com hidrolato de *Marrubium vulgare* na concentração de 0,15 mL.L⁻¹ e conseguiram reduzir em 85% a podridão causada por *P. expansum* (ZATLA et al., 2019).

Embora ainda não tenha sido bastante investigado, além do potencial para o controle de doença, alguns hidrolatos também tem apresentado efeito na promoção de crescimento de plantas. Suradkar et al. (2016) destacaram que 5 mL do hidrolato de *Ipomea carnea* resultou em plantas de milho com maior altura. Em outro caso, Seong et al. (2019) também reportaram que o hidrolato de *Lavandula angustifolia* Mill contribuiu para aumento na altura (14,43 cm), comprimento (11,37 cm) e largura (11,07 cm) das folhas de plantas de *Nicotiana benthamiana*, principalmente quando aplicado no estágio inicial de crescimento.

Os OEs e hidrolatos de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* podem ser uma opção para o controle da podridão vermelha, uma vez que possuem atividade antifúngica comprovada contra várias espécies do gênero *Aspergillus* (PANDEY et al., 2016; PIRAS et al., 2018), *Moniliophthora* (LOZADA et al., 2012), *Colletotrichum* (BRITO, 2018), *Botrytis* e *Uromyces* (OXENHAM et al., 2005). Além disso, o uso do hidrolato na produção de mudas de sisal pode promover o crescimento das plantas e resultar em plantas menos susceptíveis ao ataque do *A. welwitschiae*.

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown

L. alba (Mill.) N. E. Brown é uma espécie medicinal que pertence à família Verbenaceae. Originária das Américas Central e Sul, encontra-se amplamente dispersa em todo território brasileiro, onde é conhecida popularmente como erva-cidreira (MACHADO et al., 2014; TAVARES et al., 2011). Trata-se de um arbusto aromático, medindo até 2m de altura, haste ereta de coloração castanha, ramos simpodiais, folhas macias com coloração das fases diferentes, ovadas, opostas, membranáceas, limbo com margem serrilhada, face adaxial do limbo verde, pecíolo piloso, brácteas verdes, inflorescências axilares racemosas e perianto do tipo labiada, exibindo pétalas lilás-claro (CARVALHO, 2017).

Estudos etnobotânicos relatam indicações terapêuticas da *L. alba*, principalmente com a utilização de suas folhas para preparos de infusões, decocções, macerações, compressas e banhos. Algumas propriedades bioativas dessa planta medicinal são

mencionadas na literatura como ação antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, antihelmíntica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral (AGUIAR et al., 2008; SANTOS et al., 2018).

Existe uma ampla variabilidade relacionada a composição química de espécies de *L. alba*, o que permite que sejam agrupados os genótipos em quimiotipos (TAVARES et al., 2011; TEXEIRA, 2009). Essa diversificação de componente químico pode ser influenciada por alguns aspectos tais como, condições edafoclimáticas, fase de desenvolvimento da planta, parte da planta, horário, idade da planta, época do ano, além dos métodos de secagem e extração do óleo essencial (CARVALHO, 2017; TELES et al., 2012).

Ocimum basilicum L.

O *O. basilicum* L. (manjeriço) é amplamente distribuído em regiões tropicais da Ásia, África, América Central e América do Sul. O manjeriço adaptou-se as condições edafoclimáticas brasileiras, podendo ser cultivado durante o ano todo. Essa planta aromática e condimentar de grande valor econômico e é utilizado para adicionar aroma e sabor na indústria de cosmético e culinária (LIBER et al., 2011; PATON et al., 1999). Além disso, o manjeriço é tradicionalmente usado para combater tosse, gripe, pressão alta, dor de barriga, diabetes, calmante, expectorante e disfunções renais (BAKKALI et al., 2008; GOMEZ et al., 2016).

A composição dos óleos essenciais de manjeriço varia de acordo com a espécie e a localização geográfica, sendo classificados em quatro quimiotipos, de acordo com os componentes majoritários do óleo: quimiotipo linalol-metil chavicol (Europeu), metil chavicol (Reunião), metil cinamato (Tropical) e quimiotipo eugenol (Java) (SUPPAKUL et al., 2003). Todavia, a composição dos OEs pode variar de acordo com o genótipo, condições climáticas, tratamento agrônomico e estágio de desenvolvimento (MURÁRIKOVÁ et al., 2017; NURZYNSKA et al.; 2013). Dessa forma, Brito, (2018) encontrou o Linalol (28,43%) e Estragol (18,43%) como componentes majoritários no OE do manjeriço produzido no Estado Bahia, Brasil.

Referências Bibliográficas

ABO-EL-SEOUD, M. A.; EL-TOBGY, K. M. Production of environmentally safe biocides from essential oils having antimicrobial activity. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 43, n. 4, p. 324–331, 2010.

ABREU, K. C. L. DE M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010.

AGUIAR, J.S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.3, p. 436-440, 2008.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. Diagnóstico sócioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro. Fortaleza: Bando do Nordeste do Brasil, p.90, 2005. (Série Documentos do ETENE, 4).

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BASSOLÉ, I. H. N. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p.1070-1074, 2011.

BASSOLÉ, I. H. N. et al. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7825-7839, 2010.

BASU, G. et al. Potentiality for value-added technical use of Indian sisal. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n.1, p. 33–40, 2012.

BELABBES, R. et al. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from western Algeria. **Chemistry and Biodiversity**, v.14, e.1600482, 2017.

BOUBAKER, H. et al. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 95-101, 2016.

BOYRAZ, N.; OZCAN, M. Antifungal effect of some spice hydrosols. **Fitoterapia**, v. 76, n.7-88, p. 661- 665, 2005.

BOYRAZ, N.; OZCAN, M. Inhibition of phytopathogenic fungus by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n. 3, p. 238-242, 2006.

BRITO, S. S. DA S. Levantamento de espécies espontâneas, suas potencialidades bioativas e caracterização de artrópodes no sistema produtivo da cultura de sisal (*Agave sisalana* Perrine) na Bahia. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2018.

BROWN, K. *Agave sisalana* Perrine. *Wildlands weeks*, p. 18-21, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAROVIĆ-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v.119, n.1, p. 196–201, 2010.

CARVALHO, Z. S DE. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown: Caracterização e Potencial Fitoquímico. 2017. Tese (Doutorado Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brazil, 2017.

CHEN, Q. et al. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2441-2447, 2014.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n.3, p. 1-21, 2017.

COUTINHO, W. M. et al. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, p. 4, 2006. (Embrapa Algodão. **Comunicado Técnico, 281**).

D'AMATO, S. et al. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, v.86, p.126–137, 2018.

DEBNATH, M. et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.3, p.177-187, 2010.

DE MATOS, I.L. et al. Constituents of essential oil and hydrolate of leaves of *Campomanesia vianonis* LANDRUM. **Quimica Nova**, v.10, p. 1289-1292, 2015.

DUARTE, E.A.A. et al. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontier Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 2018.

FAOSTAT. (2020). Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. Retrieved Março 28, 2020, from: <http://faostat.fao.org/>

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, n.9, p. 1126-1130, 2007.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2007.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, A.; DEL RÍO, J. C. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 81–87, 2008.

GOMEZ, M.; ROCHA, E. A.; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, v.10, n.2, p 115-140, 2016.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, janeiro de 2017**. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Accessed 11 August 2018.

JALLALI, I. et al. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1031–1038, 2014.

KHALEDI, N.; TAHERI, P.; TARIGHI, S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, n.3, p. 704-717, 2015.

KUMAR, P. et al. *In vivo* and *in vitro* control activity of plant essential oils against three strains of *Aspergillus niger*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 21948-21959, 2017.

LA TORRE, A. et al. Using plant essential oils to control Fusarium wilt in tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 3, p. 487-496, 2015.

LEI, G. et al. Chemical composition of essential oils and hydrosols from fresh flowers of *Cerasus subhirtella* and *Cerasus serrulata* from East China. **Natural Product Research**, v.2, p.1923-1925, 2014.

LIBER, Z.; CAROVIC-STANKO, K.; POLITEO, O. Chemical Characterization and Genetic Relationships among *Ocimum basilicum* L. Cultivars. **Chemistry and Biodiversity**, v8, n. 11, p.1978-1989, 2011.

LIM T. K. *Agave sisalana*. In: Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Springer, Dordrecht. 2014.

LOZADA, B. S. et al. *In vitro* effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronómica**, v. 61, n. 2, p. 94-102, 2012.

MACHADO, T.F.; PEREIRA, R.C.A.; BATISTA, V.C.V. Seasonal variability of the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n.3, 515-519, 2014.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, p.286, 1954.

MOUSAVI, S. M.; RAFTOS, D. *In Vitro* Antifungal Activity of a New Combination of Essential Oils Against Some Filamentous Fungi. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, n. 2, p.156-161, 2012.

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, v 22, p. 1221, 2017.

NETO, I. L. da C.; MARTINS, F. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine ex. Engelm (Agavaceae). **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 72-78, 2012.

NURZYNSKA-WIERDAK, R. Morphological Variability and Essential Oil Composition of four *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Modern Phytomorphology**, v.3, p.115–118, 2013.

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 3, p. 174-180, 2005.

PANDEY, A. K.; SONKER, N.; SINGH, P. Efficacy of Some Essential Oils Against *Aspergillus flavus* with Special Reference to *Lippia alba* Oil an Inhibitor of Fungal Proliferation and Aflatoxin B1 Production in Green Gram Seeds during Storage. **Journal of Food Science**, v. 81, n.4, p. M928-M934, 2016.

PATON, A.; HARLEY, R.M.; HARLEY, M.M. *Ocimum*: an overview of classification and relationships, In: Basil the genus *Ocimum*, Ed: **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, The Nederland, p.1-38, 1999.

PIRAS, A. et al. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 89-97, 2018.

RAJESWARA RAO, B.R. Hydrosols and water-soluble essential oils: medicinal and biological properties. Recent progress in medicinal plants. *Essential oils I*, v. 36, p. 119-140, 2013.

SANTOS, A.P.G.; OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, V.J.S. Uso e eficácia da erva cidreira, um comparativo entre conhecimento científico e senso comum: metassíntese. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 2, 2018.

SEONG, E.S. et al. Effect of lavender hydrosol on antioxidant activity and growth in *Nicotiana benthamiana*. **Brazilian Journal of Botany**, v.42, p. 23–28, 2019.

SHAHANI, S. et al. Chemical Composition of Essential Oil and Hydrolat of *Geum iranicum Khatamaz*. **Journal of Essential Oil Research**, v.23, n.6, p. 29–33, 2011.

SILVA, O. R. R. F. et al. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. **Circular Técnica n. 123**, Embrapa, Campina Grande, PB, julho, 2008.

SILVA, O. R. R.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Embrapa-CNPQ. Campina Grande, Brasil, p.205, 1999.

SOYLU, E. M.; KURT, Ş.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3 p. 183-189, 2010.

STEWART, J. R. Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. **Frontier in Plant Science**, v.6, p.684, 2015.

STURCHIO, E. et al. Essential oils: an alternative approach to management of powdery mildew diseases. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n. 3, p. 385-395, 2014.

SUPPAKUL, P. et al. Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.11, 3197–3207, 2003.

SURADKAR, V. B. et al. Effect of Hydrosol of *Ipomea carnea* Leaves, Flowers and *Lantana Camera* Leaves on the growth of wheat, maize and cotton plant. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.7, n.8, p.3477- 3479, 2016.

TABTI, L. et al. Control of fungal pathogens of *Citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.87, p. 279-285, 2014.

TABET ZATLA, A. et al. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. **Journal of Essential Oil Research**, v.29, n.5, p. 391-399, 2017.

TANOVIĆ, B. et al. Development of a Thyme Essential Oil Formulation and Its Effect on *Monilinia fructigena*. **Journal Pesticides and Phytomedicine**, v. 28, n. 4, p. 273–280, 2013.

TAVARES, I.B.; MOMENTÉ, V.G.; NASCIMENTO, I.R. do. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.204–220, 2011.

TELES, S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E Brown. **Industrial Crops and Products**,v. 37, p.247–252, 2012.

TEWARI, D.; TRIPATHI, Y. C.; ANJUM, N. *Agave sisalana*: a plant with high chemical diversity and medicinal importance. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3 n. 8, p. 238-249, 2014.

TEIXEIRA, A.B. Avaliação das atividades antimicrobianae antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, 2009.

VAVALA, E. et al. Antibacterial activity of essential oils mixture against PSA. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 30, n. 4, p. 412-8, 2015.

ZATLA, A. T. et al. Efficacy of essential oil and hydrosol extract of *Marrubium vulgare* on fungi responsible for apples rot. **Anti-Infective Agents**, v.17, 2019.

ARTIGO 1

APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown E *Ocimum basilicum* L. COMO ESTRATÉGIA NO CONTROLE PREVENTIVO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine)

Aplicação do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Ocimum basilicum* L. como estratégia no controle preventivo da Podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine)

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Resumo: A aplicação de óleos essenciais (OEs) é uma estratégia utilizada no controle de fungos fitopatogênicos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação dos OEs de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum*, individualmente e combinados sobre *A. welwitschiae*, agente causal da podridão vermelha do sisal. As concentrações testadas variaram de 0,25 a 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e 0,06 a 4 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente. A escolha dessas concentrações ocorreu pela ação sobre *A. welwitschiae*, tendo nesses intervalos, concentrações com e sem efeito inibitório. A concentração mínima inibitória foi de 2 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ em ambos OEs e apenas a concentração de 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *L. alba* apresentou ação fungicida. O efeito da combinação entre os OEs sobre *A. welwitschiae* foi de indiferente. A aplicação de OEs inibiu a germinação de esporos, com destaque para as concentrações 16 e 8 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *L. alba* e as suas combinações com 4, 2, 1 e 0,5 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *O. basilicum*, com inibição de 99 %. Os OEs individuais (2; 4; 8 e 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *L. alba* e 0,5; 1; 2 e 4 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de *O. basilicum*) e combinados (16 + 0,5 a 4; 8 + 0,5 a 4; 4 + 0,5 a 4; 2 + 0,5 a 4) reduziram entre 12-30 % o crescimento micelial e a inibição da esporulação ocorreu de maneira depende da concentração e combinação. A aplicação de OEs originou alterações morfológicas nas hifas como contorcimento, extravasamento do conteúdo celular e afinamento, e nos conidióforos como imaturidade e má formação. O tratamento das mudas de sisal com os OEs proporcionou redução no índice da doença variando de 34-82 %. A histologia evidenciou que a lignificação celular foi o mecanismo de defesa presente nas mudas que apresentaram redução no índice da doença. Além disso, também foram observadas alterações morfológicas no patógeno similares aos testes *in vitro*. Os OEs

testados individuais e combinados apresentam potencial para o controle preventivo da podridão vermelha do sisal.

Palavra-chave: *Aspergillus welwitschiae*, efeito inibitório, alterações morfológicas, índice da doença

Application of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Ocimum basilicum* L. as a strategy for the preventive control sisal bole rot disease (*Agave sisalana* Perrine)

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Abstract: The application of essential oils (EOs) is a strategy used to control phytopathogenic fungi. The objective of the work was to evaluate the effect of the application of *Lippia alba* and *Ocimum basilicum* EOs, individually and combined on *A. welwitschiae*, causal agent of sisal bole rot disease. The tested concentrations ranged from 0.25 to 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ and 0.06 to 4 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ for *L. alba* and *O. basilicum*, respectively. The choice of these concentrations occurred through the action on *A. welwitschiae*, having in these intervals, concentrations with and without inhibitory effect. The minimum inhibitory concentration was 2 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ in both EOs and only the concentration of 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ of *L. alba* showed fungicidal action. The effect of the combination between the OEs on *A. welwitschiae* was indifferent. The application of EOs inhibited spore germination, with emphasis on concentrations 16 and 8 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ of *L. alba* and its combinations with 4, 2, 1 and 0.5 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ of *O. basilicum*, with 99% inhibition. The individual EOs (2; 4; 8 and 16 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ of *L. alba* and 0.5; 1; 2 and 4 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ of *O. basilicum*) and combined (16 + 0.5 to 4 ; 8 + 0.5 to 4; 4 + 0.5 to 4; 2 + 0.5 to 4) reduced mycelial growth between 12-30% and the inhibition of sporulation occurred in a manner dependent on concentration and combination. The application of EOs caused morphological changes in hyphae such as contortion, leakage of cellular content and tuning, and conidiophores as immaturity and malformation. The treatment of sisal seedlings with EOs provided a reduction in the disease rate ranging from 34-82%. Histology showed that cell lignification was the defense mechanism present in seedlings that showed a reduction in the disease index. In addition,

morphological changes in the pathogen similar to in vitro tests were also observed. The tested and individual EOs have potential for preventive control of sisal bole rot disease.

Keyword: *Aspergillus welwitschiae*, inhibitory effect, morphological changes, disease index

1. Introdução

O Brasil, com uma produção de 86 820 toneladas, em 2019, é o maior produtor mundial de fibra de sisal (FAOSTAT, 2019). A fibra é extraída da planta do sisal, *Agave sisalana* Perrine, e representa apenas 4 % da folha sendo os restantes 96% considerados resíduos. A produção de sisal ocorre no Bioma Caatinga, área com os mais baixos índices de desenvolvimento humano (IDH) do Brasil, em que o sistema produtivo desta planta, apesar da sua importância econômica e social, apresenta uma grande ineficiência produtiva, e impacto ambiental considerável devido ao elevado volume de resíduos gerado. Estas razões associadas a longos períodos de estiagens, e sobretudo a uma doença que ataca a planta, a podridão vermelha do sisal (Silva et al., 2008), fazem com que este sistema produtivo esteja em declínio (FAOSTAT, 2019).

A podridão vermelha é uma doença monocíclica e o principal problema fitossanitário da cultura do sisal. Nas áreas produtoras, as plantas sintomáticas se destacam por apresentam folhas amareladas e murchas e ao realizar o corte do caule é observado uma coloração variando do vermelho intenso a marrom (Duarte et al., 2018). Com o progresso da infecção, o caule apodrece totalmente, causando a morte e tombamento da planta. Esta doença, para além de causar a morte da planta, reduzindo a área plantada (ha), também inviabiliza a utilização das folhas infectadas para o desfibramento contribuindo na diminuição na produção de fibra (toneladas). O agente causal da doença é o fungo filamentoso *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018).

A. welwitschiae é um patógeno necrotrófico que pode infectar o caule das plantas em todos os estádios de desenvolvimento, necessitando da presença de lesões no caule para que possa iniciar o processo de infecção (Duarte et al., 2018). Até o momento, os diferentes meios de controle utilizados contra a podridão vermelha do sisal não se têm mostrado efetivos. Com efeito, não é conhecido nenhum produto com ação fungicida eficaz e que seja recomendado pelas autoridades oficiais, fazendo com que haja grandes perdas pela ação desta doença.

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos aromáticos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e podem desempenhar diferentes funções, como a proteção contra fungos, bactérias, vírus e insetos (Chouhan et al., 2017). Devido aos seus princípios bioativos, a aplicação de OEs tem sido cada vez mais investigada no controle de doenças de plantas e tem demonstrado resultados significativos, como o controle da antracnose em banana causada por *Colletotrichum musae* com aplicação de 6.000 µl/L e 3.000 µl/L de OE de *Ocimum basilicum* and *O. gratissimum*, respectivamente (Madjouko et al., 2019). Frutos de tomates tratados com o OE *O. basilicum* na concentração de 6% apresentaram redução na infecção de *Alternaria alternata* em 62,3% (Perveen et al., 2020). Mudas de tomate tratadas com o OE de *Eugenia caryophyllata* Thunb reduziram em 42 % a fusariose causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (La Torre et al., 2015). Os OEs também podem atuar sobre diferentes patógenos numa mesma cultura, como o OE de *Mentha piperita* que foi eficiente em diminuir o índice da doença em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *Rhizoctonia solani* (Kuhn) (68 %) e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (72 %) (Khaledi et al., 2015).

O uso combinado de OEs tem sido uma estratégia adotada no aumento da eficiência de controle (Habbadi et al., 2018). Uma mistura dos óleos essenciais (1:1) de *Origanum compactum* e *Thymus vulgaris*, inoculados no caule ferido de tomateiro e videira a 0,312 mg/mL como tratamento preventivo, reduziu tanto o número de plantas que desenvolveram sintomas de galhas quanto o tamanho dos tumores causados por *Agrobacterium (Allorhizobium) vitis* (Habbadi et al., 2018). Nikkhah, M., e Hashemi, (2020) reportaram que a combinação tripla dos OEs de canela (0,156 g L⁻¹), alecrim (0,625 g L⁻¹) e tomilho (0,078 g L⁻¹) proporcionaram melhor controle na deteriorização de frutos de jujuba (*Ziziphus jujuba* Mill) causada por *A. Alternata* e *Penicillium expansum*. Apesar dos resultados dessas pesquisas, vale ressaltar que dependendo dos constituintes que compõem os OEs e/ou do microrganismo alvo, a combinação dos OEs pode apresentar diferentes efeitos (sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico) (Bassolé et al., 2011), que por sua vez podem aumentar, manter ou diminuir a sua bioatividade.

Sendo assim, a utilização de OE pode ser uma estratégia no controle da podridão vermelha do sisal e deve ser investigado. E ainda pode ser uma oportunidade de valorizar espécies endêmicas da Caatinga, contribuindo no redesenho dos agroecossistemas produtivos de sisal. As Lippias são endêmicas da Caatinga e exercem influência nas interações ecológicas neste sistema, podendo ser produzidas nas entrelinhas do sisal e

contribuir na geração de renda do agricultor e diminuição dos danos econômicos ocasionado pelo fitopatógeno.

Os OEs de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Ocimum basilicum* L. possuem ampla variabilidade relacionada a sua composição química e tem atividade antifúngica comprovada na inibição da germinação de esporos e crescimento micelial em espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (Abou El-Soud et al., 2015; Pandey et al., 2016). O fácil cultivo dessas duas espécies medicinais e a bioatividade comprovada dos seus OEs são critérios de grande importância e fundamentais para a seleção de OEs com potencial para o controle da podridão vermelha do sisal.

O objetivo foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *L. alba* e *O. basilicum* aplicados individualmente e combinados sobre *A. welwitschiae* e no controle da podridão vermelha do sisal.

2. Material e Métodos

2.1. OEs e isolamento de *A. welwitschiae*

L. alba (HURB 8794) e *O. basilicum* (HURB 521) foram cultivadas no campo experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'0" S e 39°06'0" W, altitude 200 m). Sessenta dias após o plantio, as plantas foram coletadas (caule e folhas) e foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C ± 2 até atingir o peso constante. A extração dos OEs foi realizada por hidrodestilação utilizando aparato do tipo Clevenger. O OE extraído foi armazenado na ausência de luz e sob refrigeração até a sua utilização.

O isolado A1P1 de *A. welwitschiae* (MN022875) utilizado em todos os experimentos pertence ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. A suspensão de esporos de *A. welwitschiae* foi obtida de uma cultura pura crescida em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a 28 ± 2 °C por oito dias. Após esse período, adicionou-se 20 mL de água destilada autoclavada e duas gotas de Tween 20® e os esporos foram suspensos com auxílio da Drigalsky. A concentração de esporos foi ajustada com base na contagem em câmara de Neubauer para 1x10⁶ e 1x10⁷ conídios. mL⁻¹ nos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Barbosa, 2019).

2.2. Testes *in vitro*

2.2.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória-MIC e Checkerboard

Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e na concentração inibitória fracionada (CIF) foi empregado o método de microdiluição, utilizando placas de 96 poços, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com adaptações. O método checkerboard foi empregado para avaliar diferentes interações da combinação entre OE de *L. alba* e *O. basilicum*. As concentrações dos OEs foram produzidas a partir de soluções estoque (32 mg. mL^{-1} em 10% Tween 20®) e foram diluídas em meio líquido Batata Dextrose (BD) para produzir concentrações finais variando de 0,25 a $16 \text{ } \mu\text{L. mL}^{-1}$ e 0,06 a $4 \text{ } \mu\text{L. mL}^{-1}$ para *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente. A escolha dessas concentrações ocorreu pela ação sobre *A. welwitschiae*, tendo nesses intervalos, concentrações com e sem efeito inibitório. As concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e $16 \text{ } \mu\text{L. mL}^{-1}$ para *L. alba* e 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2 e $4 \text{ } \mu\text{L. mL}^{-1}$ para *O. basilicum* e suas combinações (v/v) (**16** + 0,06 a 4; **8** + 0,06 a 4; **4**+ 0,06 a 4; **2** + 0,06 a 4; **1** + 0,06 a 4; **0,5** + 0,06 a 4; **0,25** + 0,06 a 4) foram distribuídas de forma decrescente nos eixos horizontais e transversais das placas. Além das concentrações foram adicionados três controles: 1- BD + *A. welwitschiae*; 2- Diluente Tween 20 (10%) + *A. welwitschiae* e 3- Antifúngico (Ciclopirox de Olamina $400 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) + *A. welwitschiae*. Em cada poço foram adicionados $50 \text{ } \mu\text{L}$ da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1×10^6 conídios. mL^{-1}). As microplacas foram mantidas em incubadora tipo BOD a $28 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 72 h. Após esse período, observou-se visualmente o crescimento fúngico dos poços e comparou com controle 1. Determinaram-se como MIC a menor concentração capaz de impedir o crescimento do microrganismo e determinaram-se os valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) correspondente as diferentes interações: sinergismo quando $\text{ICIF} \leq 0,5$, aditividade quando $\text{ICIF} > 0,50$ e $< 1,0$, indiferente se $\text{ICIF} > 1$ e < 2 e antagônica quando $\text{ICIF} > 2,0$ (EUCAST, 2000). Todos os ensaios foram realizados em triplicada.

2.2.2. Inibição da germinação de esporos de *A. welwitschiae* por OEs

O efeito dos OEs na germinação de esporos de *A. welwitschiae* foi testado em placas de 96 poços adicionando $50 \text{ } \mu\text{L}$ de meio BD, $50 \text{ } \mu\text{L}$ da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1×10^6 conídios. mL^{-1}) e $50 \text{ } \mu\text{L}$ dos OEs *L. alba* (2 a $16 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$) e *O. basilicum* (0,5 a $4 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$) ou $50 \text{ } \mu\text{L}$ das combinações (v/v) (16+4; 16+2; 16+1; 16+0.5; 8+4; 8+2; 8+1; 8+0.5; 4+4; 4+2; 4+1; 4+0.5; 2+4; 2+2; 2+1 e 2+0.5). O tratamento

controle foi composto apenas pelo meio BD e *A. welwitschiae*. As microplacas foram seladas e mantidas em BOD a 28°C por 24h. Após a incubação, todos os tratamentos receberam uma gota (5 µL) de azul de lactofenol para inativar o crescimento fúngico. A avaliação ocorreu por meio de montagem de lâminas com a suspensão de esporos retirada dos poços. Em 100 esporos foi avaliado o número de esporos germinados ao microscópio.

2.2.3. Inibição do crescimento micelial e esporulação de *A. welwitschiae*

2.2.3.1 Método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi realizado seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). As concentrações dos OEs *L. alba* (2 a 16 µL.mL⁻¹) e *O. basilicum* (0,5 a 4 µL.mL⁻¹) e suas combinações (v/v) (16+4; 16+2; 16+1; 16+0.5; 8+4; 8+2; 8+1; 8+0.5; 4+4; 4+2; 4+1; 4+0.5; 2+4; 2+2; 2+1 e 2+0.5) foram adicionados ao meio BDA. O tratamento controle foi constituído do meio sem adição de OEs. Após a homogeneização, os meios foram distribuídos em placas de Petri (90 mm) e no centro de cada placa foi inoculado 10 µL da suspensão de *A. welwitschiae* (1x10⁶ conídios.mL⁻¹). As placas foram vedadas e mantidas a 28 °C por oito dias. Após esse período foi avaliado o crescimento micelial e esporulação. O crescimento micelial foi mensurado com uma régua milimetrada e a esporulação foi quantificada conforme a metodologia descrita no preparo da suspensão (Item 2.1). O delineamento foi o inteiramente casualizado composto por 25 tratamentos e quatro repetições.

2.2.3.2 Exposição aos compostos voláteis

O método de exposição aos compostos voláteis foi realizado de acordo com Hong et al. (2015). Discos de papel filtro estéril (5mm) foram embebidos nas concentrações de OEs de *L. alba* (2 a 16 µL.mL⁻¹) e *O. basilicum* (0,5 a 4 µL.mL⁻¹) e suas combinações (v/v) (16+4; 16+2; 16+1; 16+0.5; 8+4; 8+2; 8+1; 8+0.5; 4+4; 4+2; 4+1; 4+0.5; 2+4; 2+2; 2+1 e 2+0.5) e foram fixados na tampa das placas de Petri. Na base das placas contendo o meio BDA foi inoculado 10 µL da suspensão de *A. welwitschiae* (1x10⁶ conídios mL⁻¹). O tratamento controle consistiu de placas sem adição de OE. As placas foram vedadas e mantidas em BOD a 28°C por oito dias. Após esse período foi avaliado o crescimento micelial e esporulação conforme descrito anteriormente (item 2.2.3.1). O delineamento foi o inteiramente casualizado composto por 25 tratamentos e quatro repetições.

2.2.3.3. Efeito dos OEs e suas combinações na morfológicas de *A. welwitschiae*

A visualização das estruturas morfológicas de *A. welwitschiae* após o contato com os OEs e os compostos voláteis foi realizada através da técnica de microcultivo. Em todas as placas dos bioensaios 2.2.3.1 e 2.2.3.2 foi depositada uma lamínula esterilizada. Oito dias após o cultivo, as lamínulas foram retiradas e transferidas para lâminas contendo uma gota de azul de lactofenol e as estruturas fúngicas foram visualizadas e fotodocumentadas em microscópio (Leica DM750) acoplado com câmera digital (modelo ICC50 HD).

2.4 Teste *in vivo*

2.4.1. Produção das mudas de sisal

As mudas foram produzidas a partir de bulbilhos coletados na região produtora de sisal. Os bulbilhos foram plantados em copos plásticos (400 mL) contendo solo e permaneceram em casa de vegetação até atingirem 20 cm de altura (180 dias).

2.4.2. Experimento em casa de vegetação

O experimento foi montado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas- Bahia, Brasil.

Os tratamentos foram constituídos das concentrações individuais de $16 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (L16) do OE de *L. alba* e $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (O4) do OE de *O. basilicum* e das combinações $16 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *L. alba* + $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *O. basilicum* (L16+O4); $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *L. alba* + $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *O. basilicum* (L4+O2) e $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *L. alba* + $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *O. basilicum* (L2+O2). As concentrações e combinações foram selecionadas com base nos resultados dos experimentos dos testes *in vitro*. O controle foi formado pela inoculação de *A. welwitschiae* sem aplicação de OE. Também foi adicionado um controle sem inoculação do *A. welwitschiae* e OEs, sendo aplicado água destilada autoclavada.

No caule de todas as mudas foram feitos dois ferimentos utilizando uma agulha hipodérmica. Em cada ferimento foi aplicado 50 μL dos tratamentos. No caso das combinações foram aplicados 25 μL de cada concentração dos OEs. Vinte e quatro horas após a aplicação foi inoculado 50 μL da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1×10^7 conídios.mL⁻¹) nos mesmos ferimentos. O delineamento foi blocos casualizados formado por sete tratamentos com seis repetições e a parcela experimental foi composta por cinco plantas.

Trinta dias depois da inoculação foi avaliada a severidade da doença nas mudas. A avaliação da severidade ocorreu através do corte longitudinal do caule e foi aplicada a escala de notas descrita por Barbosa (2019). Os dados de severidade foram transformados para índice da doença, conforme a equação proposta por Mckinney (1923): Σ (nota da escala de doença * frequência) * 100 / (número de avaliações * nota máxima da escala de doença).

2.4.3. Análise histológica das mudas com e sem aplicação dos OEs.

Três mudas de cada tratamento *in vivo* (item 2.4.2) foram aleatoriamente selecionadas e as amostras de caule foram fixadas em FNT (Formalina Neutra Tamponada: tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas e conservadas em álcool etílico 70% até o momento das análises. Como o *A. welwitschiae* tem uma alta virulência (responsável por causar a morte das mudas), as amostras de caule do tratamento controle (apenas *A. welwitschiae*) foram coletadas com 15 após a inoculação, para que seja possível processar e analisar os tecidos. Os caules das mudas tratadas foram coletados com 30 dias após a inoculação.

O material conservado foi desidratado em série etílica e inserido em 2-hidroxiethylmeta-acrilato (historresina-Leica). Secções transversais e longitudinais com espessura variável (5 - 12 μ m) foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2245). Em seguida, os cortes receberam uma dupla coloração com azul de toluidina e fucsina básica (Junqueira, 1990) e as lâminas foram montadas com resina sintética (Permout/Fisher).

A foto documentação foi realizada em microscópio (Olympus BX51) acoplado ao sistema fotográfico digital (Olympus A330). As escalas das figuras foram obtidas por meio da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das ilustrações.

2.4. Análise de dados

Os tratamentos sem variabilidade foram excluídos das análises. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e para o caso de diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) nos experimentos *in vitro* e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no experimento de casa de vegetação (*in vivo*) e as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico R v. 3.0.2 (R Core Team, 2016).

3. Resultados e discussão

3.1 Teste *in vitro*

3.1.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória-MIC e Checkerboard

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos OEs de *L. alba* e *O. basilicum* sobre *A. welwitschiae* foi de 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ em ambos OEs. O OE de *L. alba* demonstrou ação fungicida na concentração de 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e ação fungistática nas concentrações 8, 4 e 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O OE de *O. basilicum* apresentou apenas ação fungistática nas concentrações 4 e 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Esse resultado mostra o potencial desses OEs, pois necessita de uma pequena quantidade (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) para inibir o crescimento do *A. welwitschiae*. Além disso, o resultado também serviu de base para a escolha das concentrações a serem testadas nos demais experimentos.

O efeito das combinações dos OEs sobre o *A. welwitschiae* determinado pela técnica de Checkerboard evidenciou uma interação indiferente (Índice de Concentração Inibitória Fraciona de 1,5) de acordo com Eucast (2000). Esse resultado permite que as combinações dos OEs de *L. alba* e *O. basilicum* sobre *A. welwitschiae* continue a ser investigada, pois o mecanismo de ação dos OEs não se inibe. O método de Checkerboard tem sido o mais utilizado na avaliação da interação das combinações de OEs (Hay et al., 2018). Hay et al. (2018) utilizaram o método para avaliar a interação entre os OEs de *L. alba* e *Rosmarinus officinalis* sobre a espécie de *A. niger* e também encontraram efeito indiferente. A combinação do OEs de *L. multiflora* e *O. basilicum* também apresentou efeito indiferente para *Staphylococcus aureus* e sinérgico para *Escherichia coli* (Bassolé et al., 2010).

3.1.2 Inibição da germinação de esporos de *A. welwitschiae* por OEs

A germinação de esporos de *A. welwitschiae* foi inibida significativamente ($p < 0,01$) pelos OEs de *L. alba* e *O. basilicum* e suas combinações (Figura 1). Todos os tratamentos diferiram do controle (BD + *A. welwitschiae*) que apresentou germinação de esporos próximo de 100 %, demonstrando uma alta viabilidade dos esporos. Os tratamentos com as maiores concentrações de *L. alba* (16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 8 μL) e suas combinações apresentaram menor número de esporos germinados (1 %). Apesar do OE de *O. basilicum* ter apresentado uma percentagem de inibição inferior à maioria das concentrações de *L. alba*, nota-se que existe uma tendência na inibição da germinação com o aumento da concentração de 0,5 para 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do OE. Possivelmente, concentrações acima de 4

$\mu\text{L.mL}^{-1}$ resultem em maiores percentagens de inibição de esporos de *A. welwitschiae*. Também observou-se um aumento no número de esporos germinados a medida que diminuía-se as concentrações individuais de ambos OEs (Figura 1). Embora as combinações tenham apresentado resultado semelhante as concentrações individuais, ainda assim o uso combinado dos OEs pode ser uma estratégia a ser considerada, pois a quantidade de OE utilizada é reduzida com a mistura (v/v).

As espécies do gênero *Aspergillus* são conhecidas pela alta produção de esporos assexuais que são leves e facilmente dispersos pelo ar (Ojeda-López et al., 2018). Uma vez em contato com o hospedeiro e tendo as condições ambientais favoráveis, o esporo inicia o processo de germinação resultando na formação das hifas que são responsáveis pela infecção e colonização do tecido do hospedeiro (Agrios, 2005). Esse processo é a primeira etapa do ciclo de vida de fungos fitopatogênicos como o *A. welwitschiae*. Com base nos resultados obtidos é possível sugerir o tratamento das plantas com esses OEs de forma preventiva, dessa forma, quando os esporos entrarem em contato com as plantas em campo, é possível que o processo de germinação seja inibido, interferindo diretamente no ciclo de vida do *A. welwitschiae* e impedindo a ocorrência de novas infecções.

3.1.3. Inibição do crescimento micelial e esporulação de *A. welwitschiae*

Os OEs individuais e suas combinações reduziram significativamente ($p < 0,01$) o crescimento micelial e esporulação de *A. welwitschiae* na técnica de difusão em ágar (Figura 3) e compostos volateis (Figura 4). Essa inibição foi causada por alterações morfológicas como hifas contorcidas (Figura 2 D) e claramente afinadas (Figura 2 C), extravasamento do conteúdo celular (Figura 2 E), conidióforo com má formação (Figura 2 G) ou ausência de conidiação (Figura 2 H), além disso os OEs induziram a formação de estrutura de resistência (clamidósporo) (Figura 2 F).

Na técnica de difusão em agar, os tratamentos L16, L16+O4, L16+O1, L16+O0,5 e L8+O4 obtiveram redução de aproximadamente 30% no diâmetro das colônias em comparação com o controle (Apenas *A. welwitschiae*). As combinações L8+O4, L2+O1 e L4+O0,5 potencializaram o efeito inibitório no crescimento micelial em comparação com os resultados obtidos pelos seus tratamentos individuais (L8, L4, L2, O4, O1 e O0,5) (Figura 3). Com relação a esporulação, todos os tratamentos conseguiram diminuir a produção de esporos, exceto os tratamentos L2 e L2+O2 que não diferiram do controle. As combinações L4+O2, L4+O1, L4+O0,5 e L2+O1 foram mais efetivas em inibir a

esporulação do que os tratamentos individuais. Em contrapartida, a combinação L16+O4 demonstrou inibição inferior quando comparado com seus tratamentos individuais (Figura 3).

Os compostos voláteis da combinação L16+O4 seguido pelas combinações L16+O2, L16+O1, L8+O4, L8+O1 e L4+O2 potencializaram a inibição das colônias, resultando em diâmetros menores em comparação com os tratamentos individuais (Figura 4). Na esporulação, exceto pelas combinações L8+O2, L2+O2, L2+O1 e L2+O0,5 que não diferiram do controle, os demais tratamentos conseguiram reduzir significativamente ($p < 0,01$) a produção de esporos (Figura 4).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos OEs, é provável que sua atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula. O fato de os OEs serem misturas complexas de moléculas apolares, lhes conferem alta hidrofobicidade, o que permite a sua divisão nos lipídios da membrana celular e mitocôndrias, resultando no rompimento e extravasamento citoplasmático e eventual morte celular (Jing et al., 2014). Alguns estudos também apontam a inibição do ergosterol como uma das causas para ruptura da membrana plasmática e conseqüentemente extravasamento do conteúdo celular dos fungos por OE (Hua et al 2014). A ausência ou redução da presença de ergosterol nas membranas fúngicas também resulta em instabilidade osmótica e metabólica da célula fúngica, comprometendo a reprodução (Nazzaro et al., 2017).

O efeito dos OEs sobre o crescimento micelial do *A. welwitschiae* são de grande importância para o controle da podridão vermelha, pois as hifas do fungo são responsáveis pela infecção e causam a degradação das células parenquimáticas do tecido caulinar (Duarte et al., 2018), sendo assim, o fato dos OEs causarem alterações morfológicas (Figura 2 C, D e E) poderá, possivelmente, interferir na patogenicidade do *A. welwitschiae* resultando em hifas menos infectivas ou comprometendo a produção de enzimas responsáveis pela degradação celular do hospedeiro.

Nos campos produtivos de sisal, o *A. welwitschiae* é encontrado em solo rizosférico e também nas diferentes partes da planta de sisal (Duarte et al., 2018). Além disso, seus esporos são facilmente dispersos pelo ar e podem infectar outras plantas. Proporcionar alterações nas estruturas reprodutivas afetou diretamente o número esporos produzidos, esse resultado também é importante para o manejo da podridão vermelha do sisal, pois o

menor número de esporos corresponde a menos fonte de inóculo e, possivelmente, reduz as chances novas infecções.

3.1.4 Teste *in vivo*

As mudas de sisal inoculadas apenas com o *A. welwitschiae* obtiveram índice da doença de 100%, resultando no apodrecimento e morte das mudas no período de 30 dias após a inoculação. A aplicação dos OEs individuais e combinados de *L. alba* e *O. basilicum* proporcionou diminuição do índice da doença de 82, 78, 75 e 70 % para os tratamentos L16, O4, L16+O4 e L4+O2, respectivamente. Entre os tratamentos, a combinação L2+O2 foi a que apresentou menor redução no índice da doença com 34%. As mudas lesionadas e tratadas com água destilada autoclavada permaneceram assintomáticas durante todo o período de avaliação, evidenciando que a lesão realizada no caule não é suficiente para causar a morte das mudas (Figura 5).

A histologia das mudas de sisal sem e com aplicação de OE elucidou a interação entre os OEs- *A. welwitschiae*- sisal (Figura 6). Nas mudas inoculadas apenas com *A. welwitschiae* foi evidenciado a colonização do tecido caulinar intensamente pelas hifas do patógeno (Figura 6 A e B). Apesar disso, também foi observado uma possível resposta de defesa da muda com a deposição de lignina em células do parênquima (Figura 6 C e D). A lignificação da parede celular é um mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (Agrios, 2005) e, no sisal esse mecanismo também foi reportado por Barbosa, (2019).

As secções das mudas tratadas com os OEs e com aplicação de água destilada autoclavada apresentaram camadas de células parenquimáticas lignificadas ao redor do tecido necrosado (Figura 6 E), sugerindo que a lignificação pode ser um mecanismo de defesa do sisal e comprova que deposição de lignina contribuiu para redução do índice da doença nas mudas inoculadas com *A. welwitschiae* (Figura 5). Além disso, as secções das mudas tratadas com 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (L16) de *L. alba*, 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *O. basilicum* (O4), L16+O4 e L4+O2 também foi observado deformações nas hifas do *A. welwitschiae* como vazias (Figura 6 F) e contorcidas (Figura 6 G) semelhantes as observações no teste *in vitro* (Figura 2 C, D e E), confirmando que o efeito dos OEs sobre a morfologia do *A. welwitschiae* também pode ocorrer em condições *in vivo*.

Os cortes das mudas tratadas com L2+O2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. alba* e 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ *O. basilicum*) apresentaram número visivelmente menor de hifas do *A. welwitschiae* em comparação com o controle (Figura 6 H), entretanto foi o único tratamento que foi

visualizado a presença de esporos do patógeno (Figura 6 J). Esse resultado também corrobora com os testes *in vitro*, pois embora o tratamento L2+O2 tenha diminuído o crescimento micelial, a produção de esporos não foi inibida significativamente (Figura 3 e 4).

Em uma das amostras (1/3) do tratamento L16+O4 e O4 além das observações já mencionadas, também foi observado a colonização do tecido por *Trichoderma* sp (Figura 6 I e K) e *Bacillus* sp (Figura 6 L), respectivamente. Possivelmente, além de atuar diretamente sobre o *A. welwitschiae*, os OEs testados também podem promover o crescimento de outros microrganismos benéficos.

O efeito da aplicação de OEs na supressão de doença em planta também foi encontrado por La Torre et al. (2015) aplicaram os OEs de *Eugenia caryophyllata* Thunb, *T. vulgaris* Willk e *R. officinalis* L. no solo rizosférico e conseguiram reduzir em 42%, 47% e 35%, respectivamente, a severidade da fusariose em mudas de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.). Embora esses autores não descrevam a quantidade aplicada no solo, os resultados obtidos com aplicação de 50 µL das concentrações de OEs de *L. alba* e *O. basilicum* e suas combinações demonstram que o tratamento das mudas de sisal com OE é uma estratégia possível de ser realizada. Futuros estudos devem ser conduzidos para avaliar outros métodos de aplicação.

A formulação de OEs é fortemente recomendada para evitar a degradação e volatilização dos componentes bioativos dos OEs quando aplicados em condição de campo no controle de doenças (Borges et al., 2018). Luiz et al. (2017) realizaram um tratamento preventivo com a pulverização de folhas de morango com 10 mL de uma emulsão de polissacarídeos de aloe e OE de *C. martini* e obtiveram redução de aproximadamente 100% da severidade da mancha angular bacteriana causada por *Xanthomonas fragariae*. Antonioli et al., (2020) avaliaram a aplicação de OE de capim-limão encapsulado e não encapsulado no tratamento de frutos de maçãs e, constataram que o tamanho das lesões da podridão causada por *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* foi três vezes menor para o tratamento com OE encapsulado. Como o cultivo do sisal ocorre em regiões com baixa precipitação e temperaturas médias anuais de até 30 °C, é importante a formulação dos OEs para que os compostos possam ser protegidos e além disso, a formulação poderá possibilitar uma maior eficiência de controle. Futuros estudos devem ser conduzidos para

elaboração de formulações com os OEs de *L. alba* e *O. basilicum* e a avaliação da sua eficiência de controle em condições de campo.

O efeito preventivo dos OEs testados abre possibilidades prática para a sua aplicação na cultura do sisal, sendo sugerido principalmente, o tratamento das mudas de sisal 24h antes do plantio no campo. Com base nos resultados desse estudo, outra opção para o uso dos OEs poderá ser a sua aplicação após o corte das folhas do sisal para o desfibramento, pois os OEs podem atuar frente ao *A. welwitschiae* (inibição da germinação e crescimento micelial) enquanto a planta realiza o processo de cicatrização (deposição de lignina nas células parenquimáticas).

Na elaboração de um manejo sustentável da podridão vermelha do sisal é importante que os produtores tenham acesso as tecnologias testadas nesse estudo, pensando nessa possibilidade, a *L. alba* é uma planta que cresce espontaneamente em regiões semiaridas permitindo que seja manejada juntamente com a cultura do sisal, enquanto que o *O. basilicum* possui uma cadeia produtiva bem desenvolvida. Sendo assim, o produtor poderá cultivar as plantas para a extração de OE e realizar a aplicação no controle da podridão vermelha do sisal como também poderá ter uma outra fonte de renda com a sua comercialização.

O manejo da podridão vermelha é necessário e de grande importância para a sustentabilidade da agaveicultura. O cultivo do sisal tem sido realizado a décadas no sistema de monocultura e com baixa biodiversidade, o que contribui para a ocorrência da podridão vermelha nas áreas produtoras e o aumento das perdas econômicas geradas pela doença. Nessa perspectiva, a *L. alba* é uma planta que cresce espontaneamente em regiões semiaridas permitindo que seja manejada nas entre linhas da cultura do sisal, enquanto que o *O. basilicum* possui uma cadeia produtiva bem desenvolvida. Dessa forma, a inserção das plantas medicinais nas áreas produtoras de sisal poderá gerar benefícios como o aumento da biodiversidade no agroecossistema, o agricultor terá a matéria prima para a extração dos OEs, que por sua vez poderão ser aplicados tanto no controle da podridão vermelha como também poderá ser uma outra fonte de renda com a sua comercialização.

4. Conclusão

- ✓ Os OEs de *L. alba* e *O. basilicum* apresentaram MIC sobre *A. welwitschiae* de 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$;

- ✓ As combinações entre as concentrações dos OEs de *L. alba* e *O. basilicum* sobre *A. welwitschiae* apresentaram efeito indiferente;
- ✓ As concentrações individuais de 16 e 8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. alba* e suas combinações com as concentrações de 0,5 a 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *O. basilicum* reduziram a percentagem de esporos germinados em 99 %;
- ✓ Os OEs individuais (2; 4; 8 e 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. alba* e 0,5; 1; 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *O. basilicum*) e combinados (16 + 0,5 a 4; 8 + 0,5 a 4; 4 + 0,5 a 4; 2 + 0,5 a 4) reduziram entre 12-30 % o crescimento micelial e diminuíram a produção de esporos de maneira depende da concentração e combinação.
- ✓ Os OEs proporcionaram alterações morfológicas nas estruturas reprodutivas e de crescimento de *A. welwitschiae*, além de induzirem a formação de clamidósporos;
- ✓ As aplicações das concentrações individuais de 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (L16) de *L. alba* e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *O. basilicum* (O4) e as combinações L16+O4 e L4+O2 reduziram a severidade da doença em mais de 70%;
- ✓ A histologia dos tecidos caulinares evidenciou que a redução na severidade esteve relacionada com a presença de células lignificadas e com o efeito dos OEs sobre as hifas de *A. welwitschiae*;

5. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

6. Referências

Abou El-Soud, NH., Deabes, M., El-Kassem, LA., Khalil, M, 2015. Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. Open Access Maced. J. Med. Sci. 3, 374-379. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2015.082>.

Agrios, GN, 2005. Plant Pathology, quinta ed. Academic Press.

Antonioli, G., Fontanella, G., Echeverrigaray, S., Paula Longaray Delamare, A., Fernandes Pauletti, G., & Barcellos, T. (2020). Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass

essential oil for postharvest decay control: *in vitro* and *in vivo* evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chemistry*, 126997. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126997

Barbosa, LO, 2019. Podridão vermelha do sisal: Controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos. Tese. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Bassolé, IHN., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R C., Dicko, MH, 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 15, 7825-7839.

<https://doi.org/10.3390/molecules15117825>.

Bassolé, IHN., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, LC., Ilboudo, AJ., Franz, C., Novak, J., Nebié, RC., Dicko, MH, 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 18, 1070-1074. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>.

Borges, DF., Lopes, EA., Moraes, ARF., Soares, MS., Visôto, LE., Oliveira, CR., Valente, VMM, 2018. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. *Crop Prot*. 110, 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.003>.

Chen, Q., Xu, S., Tao, W., Guo, J., Sha, S., Zhenga, X., Yu T, 2014. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. *J. Sci. Food Agric*. 94, 2441-2447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6576>.

Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S, 2017. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines*. 4, 1-21.
<https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.

CLSI, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M38-A2. Wayne, (2008).

CLSI, 2015. Reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard standard, 10th ed, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M7-A10. Wayne, (2015).

Duarte, EAA., Damasceno, CL., Oliveira, TAS., Barbosa, LO., Martins, FM., Queiroz, SJR., Lima, TEF., Silva, RM., Kato, RB., Bortolini, DE., Azevedo, V., Góes-Neto, A., Soares, ACF, 2018. Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. *Front. Microbiol.* 9, 1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01227>.

Eucast, 2000. Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 570-572. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00178.x>.

Faostat, 2019. Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. <http://faostat.fao.org/> (Accessed 13 March 2021).

Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., ... Lavire, C, 2018. Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environ Sci Pollut Res* 25, 29943–29952 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1008-9>

Hay, YO., Abril-Sierra, MA., Sequeda-Castañeda, LG., Bonnafous, C., Raynaud, C, 2018. Evaluation of combinations of essential oils and essential oils with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 6, 216-230.

Hong, JK., Yang, HJ., Jung, H., Yoon, DJ., Sang, MK., Jeun, YC, 2015. Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathol. J.* 31, 269-277. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027>.

Hua H., Xing F., Selvaraj JN., Wang Y., Zhao Y., Zhou L., Liu X., Liu Y, 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PLoS One.* 25;9(9):e108285. doi: 10.1371/journal.pone.0108285.

- Jing, L., LEI, Z., LI, L., XIE, R., XI, W., GUAN, Y., SUMNER, L.W. and ZHOU, Z., 2014. Antifungal activity of *Citrus* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 14, 3011-3033. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5006148>
- Junqueira, CU, 1990. O uso de cortes finos de tecidos na medicina e biologia. *Meios & Métodos*. 66, 10-11.
- Khaledi, N., Taheri, P., Tarighi, S, 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 704-717. <https://doi.org/10.1111/jam.12730>.
- La Torre, A., Caradonia, F., Matere, A., Battaglia, V, 2015. Using plant essential oils to control Fusarium wilt in tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 487-496, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0789-2>.
- Luiz, C., Neto, ACR., Franco, PO., Di Piero, RM, 2017. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. *Trop. Plant Pathol.* 42, 370-381. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0153-5>.
- Mckinney, HH, 1923. A new system of grading plant diseases. *J. Agric. Res.* 26, 195–218.
- Madjouko, MA., Nguemezi Tchameni, S., Sonwa Tchinda, E., Jazet, PMD., Kamsu, PN., Kamga, VAMS., Sameza, ML., Tchoumboungang, F., Menut, C, 2019. Inhibitory effects of essential oils from *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* on *Colletotrichum musae*: The causal agent of bananas anthracnose. *J Phytopathol.* 00, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jph.12793>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Óleos Essenciais e Atividade Antifúngica. *Pharmaceuticals* (Basel, Suíça), 10 (4), 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Nikkhah, M., & Hashemi, M, 2020. Boosting antifungal effect of essential oils using combination approach as an efficient strategy to control postharvest spoilage and

preserving the jujube fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, 164, 111159. doi:10.1016/j.postharvbio.2020.111159.

Pandey, AK., Sonker, N., Singh, P, 2016. Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special reference to *Lippia alba* oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B1 production in green gram seeds during storage. *J. Food Sci.* 81, 928-934. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13254>.

Perveen, K., Bokhari, NA., Al-Rashid, SAI., AlHumaid, LA, 2021. Chemical Composition of Essential Oil of *Ocimum basilicum* L. and Its Potential in Managing the Alternaria Rot of Tomato, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23:6, 1428-1437, DOI: 10.1080/0972060X.2020.1868351

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Silva, ORRF., Coutinho, WM., Cartaxo, WV., Sofiatti, V., Filho, JLS., Carvalho, OS., Costa, LB, 2008. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular técnica 123.

Legenda das figuras

Figura 1. Germinação de conídios de *A. welwitschiae* submetido aos óleos essenciais de *L. alba* e *O. basilicum* individual e combinado. Médias seguidas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de propabilidade. *L. alba*: L16 (16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L8 (8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); *O. basilicum*: O4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O1 (1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O0,5 (0,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

Figura 2. Características morfológicas de *A. welwitschiae* submetido aos óleos essenciais de *L. alba* e *O. basilicum* e suas combinações. (A) Conidióforo e conídios normais. (B) Hifa sem deformações. (C) Hifas afinadas e (D) contorcidas. (E) conteúdo celular extravasado. (F) Clamidósporo terminal. (G) Conidióforo mal formado e (H) imaturo. Escala: A, C, D, E, F, G e H (20 μm) e B (50 μm).

Figura 3. Crescimento micelial e esporulação de *A. welwitschiae* submetido aos óleos essenciais individual e combinado de *L. alba* e *O. basilicum* na técnica de difusão em ágar. Médias seguidas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de propabilidade. *L. alba*: L16 (16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L8 (8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); *O. basilicum*: O4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O1 (1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O0,5 (0,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

Figura 4. Crescimento micelial e esporulação de *Aspergillus welwitschiae* submetido aos compostos voláteis dos óleos essenciais individual e combinado de *L. alba* e *O. basilicum*. Médias seguidas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de propabilidade. *L. alba*: L16 (16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L8 (8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); *O. basilicum*: O4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O1 (1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O0,5 (0,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

Figura 5. Índice da doença da podridão vermelha em mudas de sisal tratadas com concentrações individuais e combinadas de OE de *L. alba* e *O. basilicum*. Médias seguidas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Tukey a 1% de propabilidade. *L. alba*: L16 (16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); L2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); *O. basilicum*: O4 (4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$); O2 (2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

Figura 6. Cortes histológicos do caule sisal sem (A, B, C e D) e com (E, F, G, H, I, J, K e L) aplicação do OE de *L. alba* e *O. basilicum* e inoculadas com *A. welwitschiae*. (A e B) Secção transversal do caule evidenciando o tecido necrosado e as hifas do *A. welwitschiae* (seta). (C e D) Células parenquimáticas com aumento da parede pela deposição de lignina (seta). (E) Corte transversal do caule tratado com OE contendo células lignificadas em volta do tecido infectado. (F, G e H) Presença de hifas de *A. welwitschiae* vazias (seta) e com deformação (seta) no tecido caulinar tratado com OE. Colonização do tecido por hifas de *Trichoderma* sp. (J e K) Produção de conídios de *A. welwitschiae* (seta) e *Trichoderma* sp. (seta), respectivamente. (L) *Bacillus* sp no tecido tratado com OE. Barra: 1 μm (B, F, G, H, J, K, e L); 150 μm (E); 60 μm (A e C) 30 μm (D) 15 μm (I).

Figura 1.

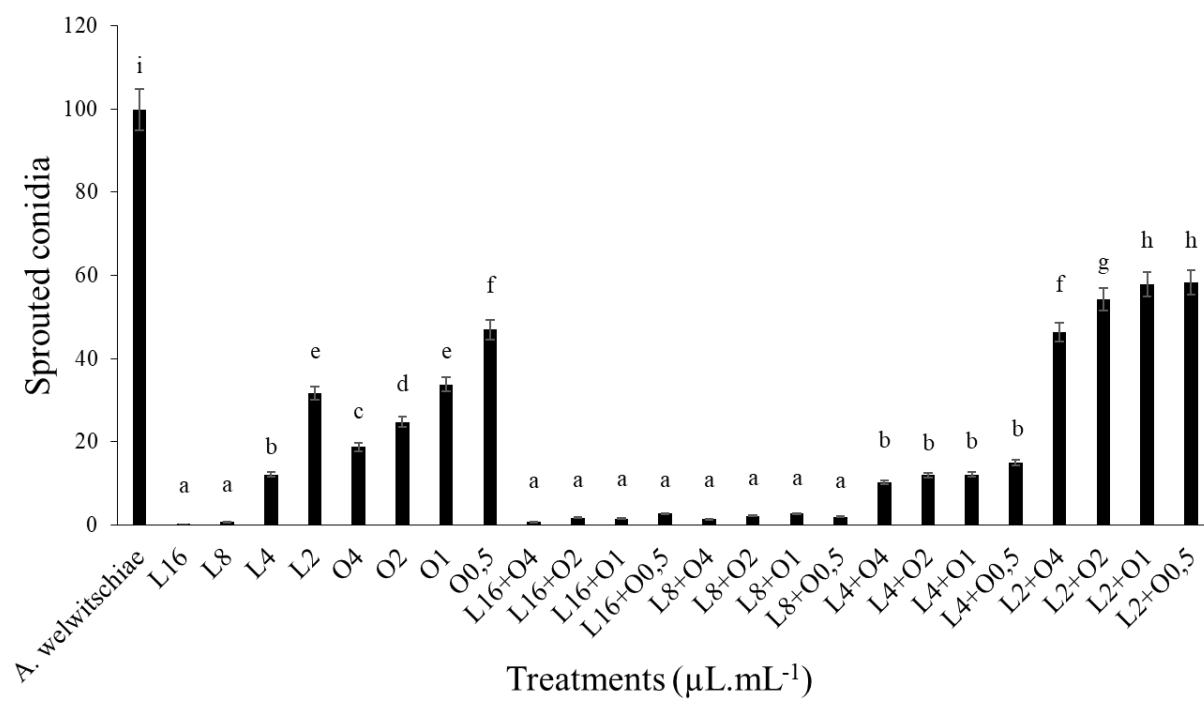


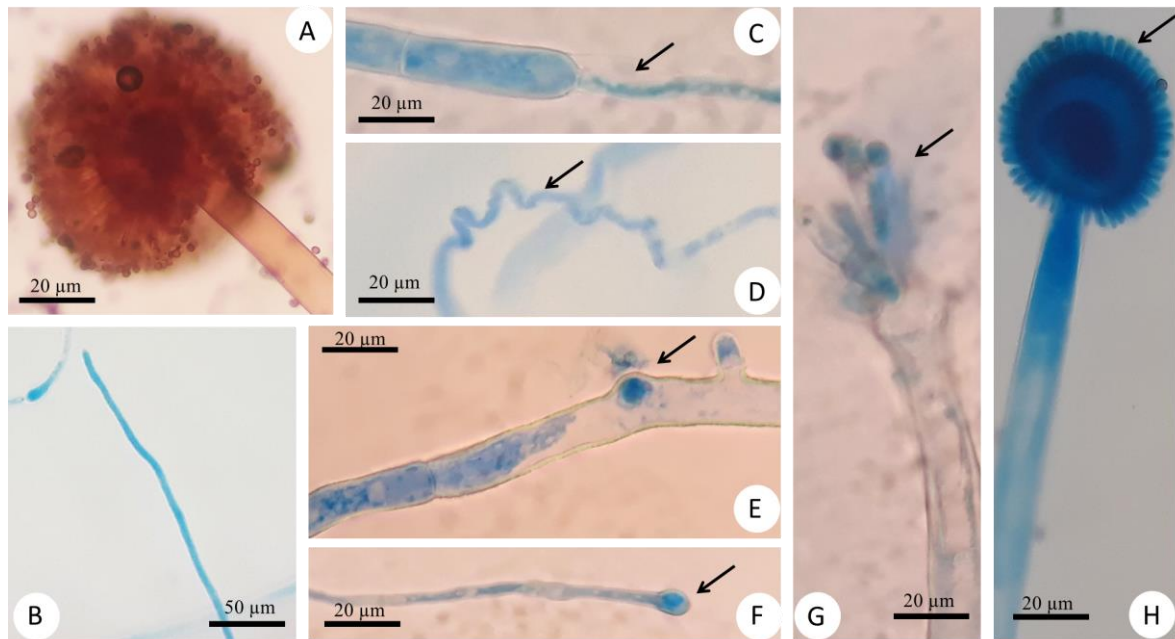
Figura 2.

Figura 3.

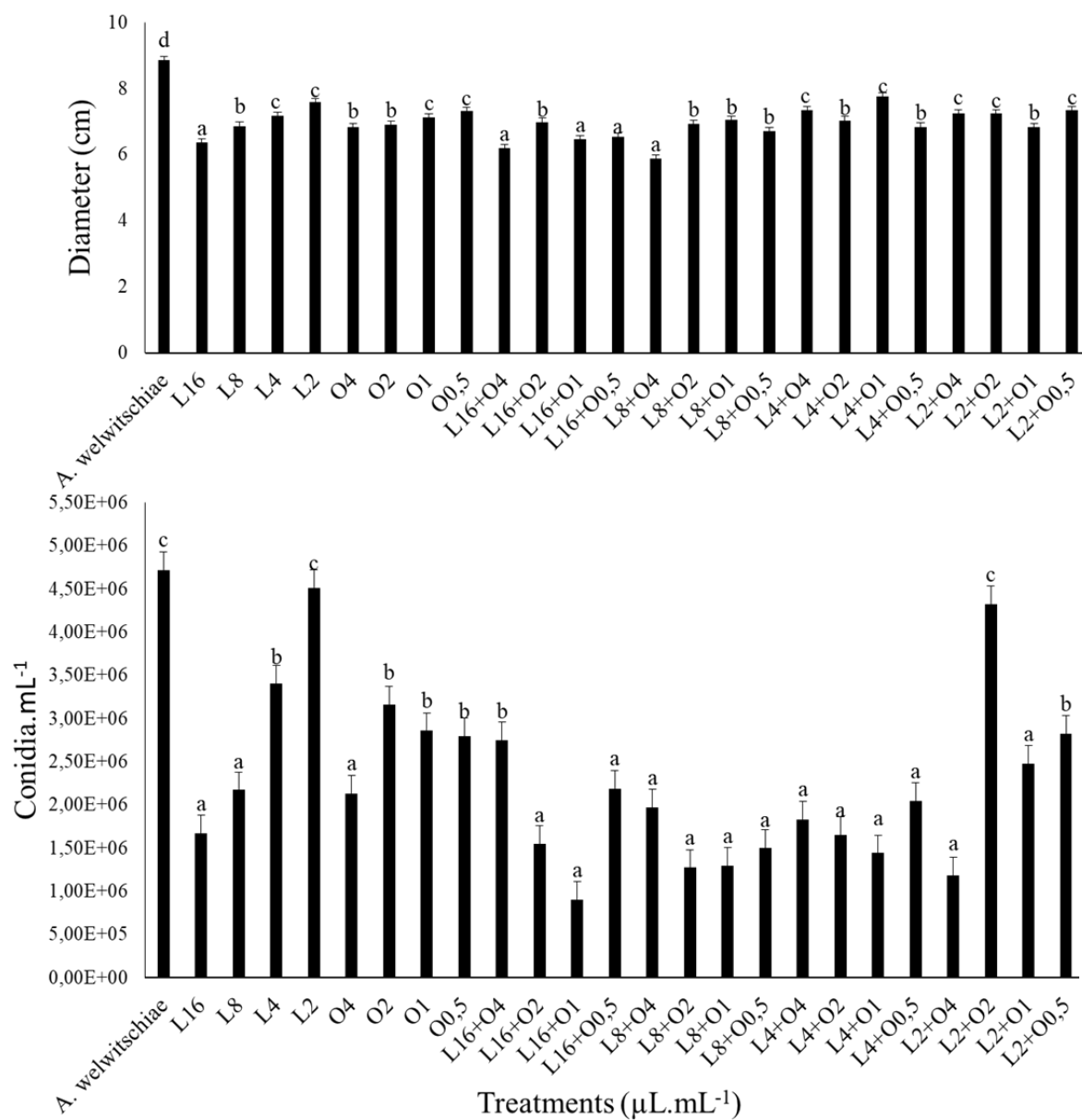


Figura 4.

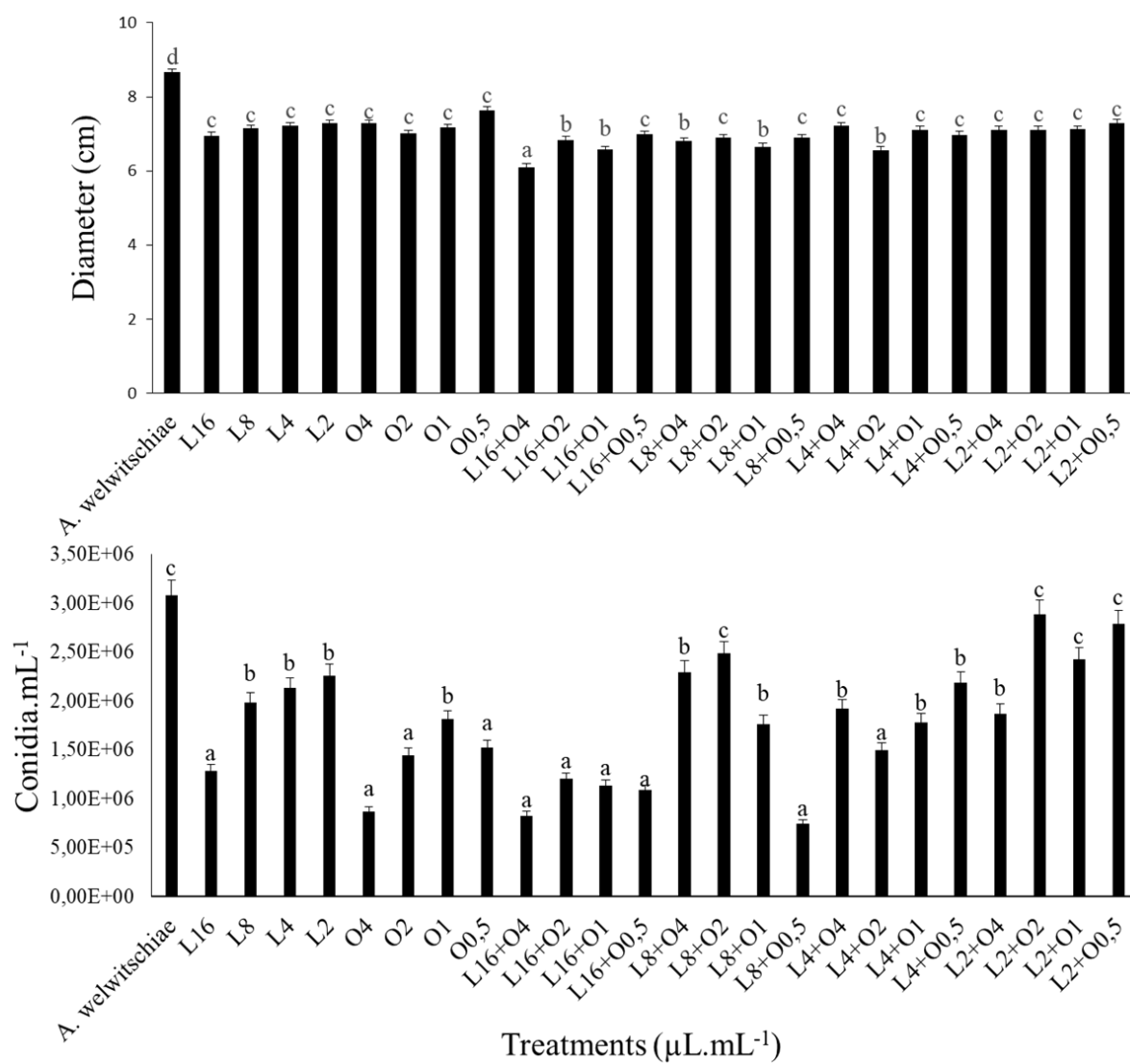


Figura 5.

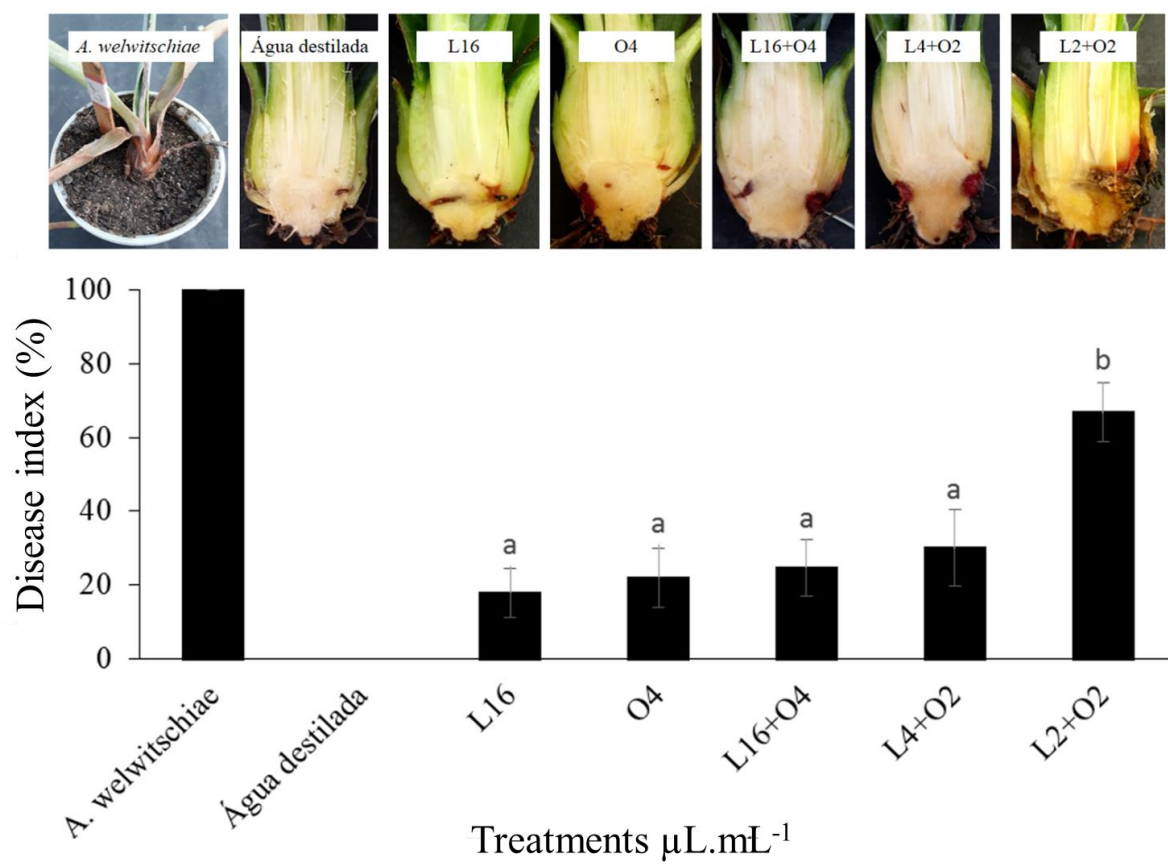
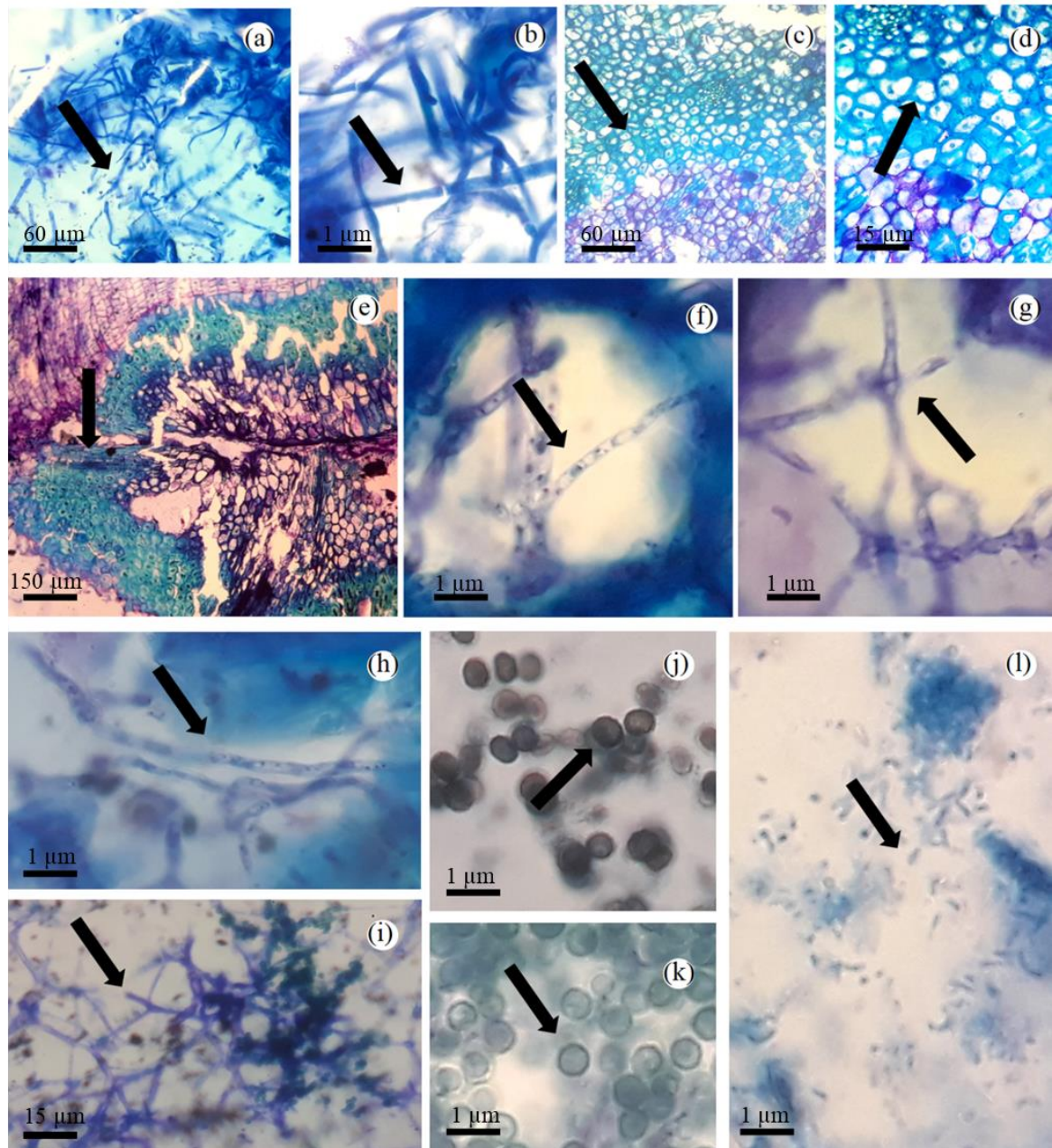


Figura 6.

ARTIGO 2

POTENCIAL DOS HIDROLATOS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown E *Ocimum basilicum* L. COMO PRODUTO NATURAL NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine).

Potencial dos hidrolatos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Ocimum basilicum* L. como produto natural no controle da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine).

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000 Cruz das Almas, BA.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Resumo: O hidrolato é um subproduto obtido no processo de extração de óleo essencial de plantas pelo método de hidrodestilação. Este subproduto é utilizado, principalmente pela indústria de cosméticos e farmacêutica, entretanto por apresentarem atividade antimicrobiana também possuem potencial para uso como produto natural no controle de fitopatógenos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos hidrolatos de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* sob o *A. welwitschiae* e no controle da podridão vermelha do sisal. As concentrações foram preparadas com adição de água destilada autoclavada para obter as concentrações de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10% para ambos hidrolatos. A concentração mínima inibitória sob o *Aspergillus welwitschiae* foi de 50% e 70% para o hidrolato de *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente. Os esporos de *A. welwitschiae* foram inibidos em 100% na concentração de 80% de *L. alba* e 33% na concentração de 90% de *O. basilicum*. O hidrolato de *L. alba* na concentração de 80% inibiu totalmente o crescimento micelial do *A. welwitschiae*, enquanto a concentração de 90% de *O. basilicum* inibiu 75%. Todas as concentrações de ambos hidrolatos conseguiram reduzir a produção de esporos em relação ao tratamento controle que apresentou aproximadamente $4,5 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹. As concentrações testadas obtiveram resultado semelhante na diminuição da agressividade do *A. welwitschiae*, obtendo redução acima de 84% a partir da concentração de 20%. As mudas tratadas com os hidrolatos e inoculadas com *A. welwitschiae* apresentaram redução no índice da podridão vermelha. As mudas que não receberam hidrolatos apresentaram índice de 100% (plantas mortas), enquanto nas mudas que foram tratadas, o índice foi reduzido em aproximadamente 94% nas concentrações acima de 70%, resultando em plantas apenas com sintomas iniciais da podridão vermelha e não morrendo durante o período de avaliação. Os resultados obtidos evidenciam que os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum* possuem potencial para atuarem como produto natural no controle da podridão vermelha do sisal.

Palavra-chave: *A. welwitschiae*, hidrossol, água aromatizada, controle alternativo.

Potential of the hydrolates of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Ocimum basilicum* L. as a natural product in the control sisal bole rot disease (*Agave sisalana* Perrine).

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000 Cruz das Almas, BA.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Abstract: Hydrolate is a by-product obtained in the process of extracting essential oil from plants by the method of hydrodistillation. This by-product is used, mainly by the cosmetics and pharmaceutical industry, however, because they have antimicrobial activity, they also have potential for use as a natural product in the control of phytopathogens. The objective of this work was to evaluate the effect of the hydrolates of *Lippia alba* and *Ocimum basilicum* on *A. welwitschiae* and on the control sisal bole rot disease. The concentrations were prepared with the addition of autoclaved distilled water to obtain concentrations of 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 and 10% for both hydrolates. The minimum inhibitory concentration under *Aspergillus welwitschiae* was 50% and 70% for the hydrolate of *L. alba* and *O. basilicum*, respectively. The spores of *A. welwitschiae* were inhibited by 100% in the concentration of 80% of *L. alba* and 33% in the concentration of 90% of *O. basilicum*. The hydrolate of *L. alba* at a concentration of 80% totally inhibited the mycelial growth of *A. welwitschiae*, while the concentration of 90% of *O. basilicum* inhibited 75%. All concentrations of both hydrolates were able to reduce spore production compared to the control treatment, which showed approximately 4.5×10^9 spores.mL⁻¹. The tested concentrations obtained a similar result in decreasing the aggressiveness of *A. welwitschiae*, obtaining a reduction above 84% from the concentration of 20%. Seedlings treated with hydrolates and inoculated with *A. welwitschiae* showed a reduction in the red rot index. Seedlings that did not receive hydrolates showed an index of 100% (dead plants), whereas in seedlings that were treated, the index was reduced by approximately

94% in concentrations above 70%, resulting in plants with only initial symptoms of red rot and no dying during the evaluation period. The results obtained show that the hydrolates of *L. alba* and *O. basilicum* have the potential to act as a natural product in the control of sisal bole rot disease.

Keyword: *A. welwischiae*, hydrosol, flavored water, alternative control.

1. Introdução

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas e podem ser extraídos por processos, como a hidrodestilação. Nesse procedimento, além do óleo essencial, também podem ser obtidos hidratos. Um hidrolato também chamado de hidrossol, água floral ou água aromatizada, corresponde à água destilada que permanece após a destilação por hidrodestilação e a separação do óleo essencial correspondente, geralmente sendo rico em componentes do óleo essencial solúveis em água (Hamdi et al., 2017; Tavares et al., 2020).

Os hidrolatos são considerados subprodutos do processo de extração dos óleos essenciais e têm sido destinados principalmente para a indústria de cosméticos e perfumarias (Di Vito et al., 2019). Apesar disso, estudos têm revelado o potencial antifúngico dos hidrolatos que, assim como os óleos essenciais também atuam na inibição de fitopatógenos e possuem potencial para atuar como um produto natural, abrindo novas possibilidades para seu uso. O hidrolato de *Satureja hortensis* L. na concentração de 15% exerceu efeito fungicida, inibindo 100% do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinérea*, *Alternaria citri* e *A. mali* (Boyras e Ozcan, 2005; 2006). Belabbes et al. (2017) constatou que o hidrolato de *Calendula arvensis* apresentou efeito antifúngico mais pronunciado do que o óleo essencial contra os fitopatógenos, causando inibição de 100% e 86,6% de *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*, respectivamente na concentração de 30 mg.mL⁻¹. O hidrolato de *Thymus capitatus* L. foi testado *in vitro* e *in vivo* contra quatro fungos fitopatogênicos *A. niger*, *A. oryzae*, *P. italicum* e *Fusarium solani* causadores da deterioração dos frutos de *Citrus sinensis*. *In vitro* foi constatado efeito fungicida sobre *P. italicum*, *F. solani*, *A. oryzae* e *A. niger* na concentração de 0,1, 0,2, 0,2 e 0,5 µg mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, frutos de *C. sinensis* foram inoculados com *P. italicum* e tratados com o hidrolato. A concentração de 0,2 µg mL⁻¹ foi suficiente para a redução total

da infecção por laranja, causando 100% de inibição do crescimento micelial (Tabti et al., 2014).

A podridão vermelha é uma doença monocíclica causada pelo fungo filamentoso *Aspergillus welwitschiae* e, é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine) (Duarte et al., 2018). O *A. welwitschiae* é um patógeno necrotrófico que ataca o caule das plantas em todos os estádios de desenvolvimento e, como resposta a infecção, a planta apresenta sintomas como folhas amareladas e murchas e o caule possui uma coloração variando do vermelho intenso a marrom (Coutinho et al., 2006; Duarte et al., 2018). Com o tempo o caule apodrece totalmente, causando a morte e tombamento das plantas. Um estudo epidemiológico realizado no Brasil, constatou que a podridão vermelha está presente nos principais polos produtores de sisal e que a sua incidência variou entre 5-40% nas propriedades investigadas (Abreu, 2010).

O sisal é uma planta CAM de regiões áridas e semiáridas e seu cultivo é voltado principalmente, para extração e comercialização da fibra das suas folhas. Devido a sua fisiologia, o sisal tem um crescimento lento, com o primeiro corte das folhas para o desfibramento ocorrendo geralmente, em 36 meses após o plantio (Silva e Beltrão, 1999). Dessa forma, a podridão vermelha é considerada uma doença de grande impacto para a sustentabilidade da cultura do sisal, pois além de levar a morte das plantas e diminuir a área plantada, as folhas das plantas infectadas também se tornam impróprias para a retirada das fibras reduzindo a produção de fibra (Duarte et al., 2018; FAOSTAT, 2020). Apesar das perdas econômicas geradas por essa doença, até o momento não existe nenhum produto recomendado para o controle da podridão vermelha e os impactos dessa doença podem continuar a crescer sem uma estratégia adequada de controle.

Um produto para o controle da podridão vermelha além de ter uma eficiência de controle sob o *A. welwitschiae* também precisa ser acessível ao produtor para que não aumente o custo da produção. Nesse contexto, os hidrolatos possuem potencial, pois são subprodutos com propriedades antifúngicas e a sua quantidade obtida com a hidrodestilação das plantas é 100 vezes maior em relação aos óleos essenciais. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos hidrolatos de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* sob o *A. welwitschiae* e no controle da podridão vermelha do sisal.

2. Material e Métodos

2.1. Hidrolatos, isolado de *A. welwitschiae* e mudas de sisal

A *L. alba* (HURB 8794) e *O. basilicum* (HURB 521) foram cultivadas no campo experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'0" S e 39°06'0" W, altitude 200 m). Sessenta dias após o plantio, as plantas foram coletadas (caule e folhas) e foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C ± 2 até atingir o peso constante. A extração dos hidrolatos foi realizada por hidrodestilação utilizando aparato do tipo Clevenger. O hidrolato extraído foi armazenado na ausência de luz e sob refrigeração até a sua utilização.

O isolado A1P1 de *A. welwitschiae* (MN022875) utilizado em todos os experimentos pertence ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. A suspensão de esporos de *A. welwitschiae* foi obtida de uma cultura pura crescida em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a 28 ± 2 °C por oito dias. Após esse período, adicionou-se 20 mL de água destilada autoclavada e duas gotas de Tween 20® e os esporos foram suspensos com auxílio da alça de Drigalsky. A concentração de esporos foi ajustada com base na contagem em câmara de Neubauer para 1x10⁶ e 1x10⁷ conídios.mL⁻¹ nos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Barbosa, 2019).

As mudas de sisal foram produzidas a partir de bulbilhos coletados na região produtora de sisal no município de Conceição do Coité, Bahia, Brasil. Os bulbilhos foram plantados em tubetes contendo uma mistura de solo e substrato comercial na proporção 1:1 e permaneceram em casa de vegetação até atingirem 20 cm de altura (180 dias).

2.2. Testes *in vitro*

2.2.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória-MIC

Para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) foi empregado o método de microdiluição, utilizando placas de 96 poços, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com adaptações. As concentrações utilizadas para hidrolato de *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente foram (90, 80, 70, 60,

50, 40, 30, 20 e 10%). Foi adicionado 50 μL da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (concentração de 1×10^6 conídios. mL^{-1}) em cada poço. Em seguida foi adicionado 200 μL de cada amostra, que foi constituída por BD e hidrolato para obtenção de concentrações entre 10 a 90%. Os tratamentos controles foram constituídos: 1- BD + *A. welwitschiae*; 2- Meio BD + *A. welwitschiae*. Todas as experiências foram realizadas em triplicada e foram repetidas duas vezes para confirmação dos resultados. A atividade antifúngica foi detectada após 72h de incubação a 28°C. Após esse período, observou-se visualmente o crescimento fúngico comparado ao controle 1 e considerou-se como MIC a menor concentração capaz de impedir o crescimento do microrganismo. Nos poços que não houve crescimento fúngico foi retirado 20 μL do conteúdo e transferiu para placa de Petri com meio BDA para confirmação da concentração fungicida mínima (CFM).

2.2.2. Inibição da germinação de esporos de *A. welwitschiae* por hidrolato

O efeito dos hidrolatos na germinação de esporos de *A. welwitschiae* foi testado em placas de 96 poços adicionando 50 μL da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1×10^6 conídios. mL^{-1}) e 200 μL constituída por BD e hidrolatos *L. alba* (10 a 90%) e *O. basilicum* (10 a 90%). O tratamento controle foi composto apenas pelo meio BD e *A. welwitschiae*. O delineamento foi o inteiramente casualizado composto por oito repetições (oito poços por tratamento). As microplacas foram seladas e mantidas em BOD a 28°C por 24h. Após a incubação, todos os tratamentos receberam uma gota (5 μL) de azul de lactofenol para inativar o crescimento fúngico. A avaliação ocorreu por meio de montagem de lâminas com a suspensão de esporos retirada dos poços. O número de esporos germinados em um total de 100 esporos aleatórios foi avaliado em microscópio.

2.2.3. Inibição do crescimento micelial, esporulação e agressividade de *A. welwitschiae*

2.2.3.1 Crescimento e esporulação de *A. welwitschiae*

O método de difusão ágar foi realizado seguindo as recomendações do CLSI (2015). As concentrações (10 a 90%) dos hidrolatos *L. alba* e *O. basilicum* foram adicionados ao meio BDA fundente. O tratamento controle foi constituído do meio sem adição de hidrolato. Após a homogeneização, os meios foram distribuídos em placas de Petri (90 mm) e no centro de cada placa foi inoculado 10 μL da suspensão de *A. welwitschiae* (1×10^6 conídios. mL^{-1}). O delineamento foi o inteiramente casualizado

composto por 19 tratamentos e cinco repetições. As placas foram vedadas e mantidas a 28 °C por oito dias. Após esse período foi avaliado o crescimento micelial e esporulação. O crescimento micelial foi mensurado com uma régua milimetrada e a esporulação foi quantificada conforme a metodologia descrita no preparo da suspensão (Item 2.1) e o resultado foi expresso em conídios.mL⁻¹.

2.2.3.2 Efeito dos hidrolatos sob a patogenicidade e agressividade de *A. welwitschiae*

Os esporos de *A. welwitschiae* produzidos durante o crescimento das colônias em meio de cultura com hidrolato (item 2.2.3.1) foram avaliados quanto a sua patogenicidade e agressividade. Mudanças de sisal produzidas a partir de bulbilhos e com 20 cm de altura foram utilizadas para a realização do ensaio experimental. O experimento foi montado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. No caule de todas as mudas foram feitos dois micro furos utilizando uma agulha hipodérmica. Em cada ferimento foi inoculado com 100 µL da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1x10⁷ conídios.mL⁻¹) de cada tratamento (item 2.2.3.1). O delineamento foi o inteiramente casualizados com cinco repetições. Trinta dias depois da inoculação do *A. welwitschiae* foi avaliada a incidência e severidade da doença nas mudas. A avaliação da severidade ocorreu através do corte longitudinal do caule e foi aplicada a escala de notas descrita por Barbosa (2019). Os dados de severidade foram transformados para índice da doença, conforme a equação proposta por McKinney (1923).

2.4 Teste *in vivo*

2.4.1. Controle da podridão vermelha do sisal em casa de vegetação.

O experimento foi montado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas- Bahia, Brasil.

Os tratamentos foram constituídos das concentrações 70 a 100% do hidrolato de *L. alba* e *O. basilicum* (baseado nos resultados *in vitro*). O controle foi formado pela inoculação do *A. welwitschiae* sem aplicação de hidrolatos. Também foi adicionado um controle sem inoculação do *A. welwitschiae* e aplicação de hidrolatos, sendo aplicada apenas água destilada autoclavada.

No caule de todas as mudas foram feitos dois micro furos utilizando uma agulha hipodérmica. Em cada ferimento foi aplicado 100 µL dos tratamentos. Vinte e quatro horas após a aplicação (baseado em testes preliminares), os mesmos ferimentos foram inoculados com 100 µL da suspensão de esporos de *A. welwitschiae* (1×10^7 conídios.mL⁻¹). O delineamento foi blocos casualizados formado por dez tratamentos com cinco repetições e a parcela experimental foi composta por oito plantas.

Trinta dias depois da inoculação do *A. welwitschiae* foi avaliada a severidade da doença nas mudas. A avaliação da severidade ocorreu conforme descrito no item (2.2.3.2).

2.4. Análise de dados

Os tratamentos controles dos experimentos foram considerados como a concentração 0%. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e para o caso de diferença significativa entre os tratamentos foi realizado a análise de regressão linear, sendo selecionado o modelo que apresentou o maior coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico R v. 3.0.2 (R Core Team, 2016).

3. Resultados e discussão

A concentração mínima inibitória (MIC) do hidrolato de *L. alba* foi de 50% com ação fungicida nas concentrações de 70, 80 e 90% e ação fungistática nas concentrações de 50 e 60%. O hidrolato de *O. basilicum* apresentou MIC na concentração de 70% e nenhuma das concentrações inibitórias (70, 80 e 90%) apresentou efeito fungicida.

A germinação de esporos de *A. welwitschiae* foi inibida significativamente ($p < 0,01$) pelos hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum*. No tratamento controle (concentração de 0%) houve a germinação de 100% comprovando a alta viabilidade dos esporos. O hidrolato de *L. alba* apresentou uma redução expressiva no número de esporos germinados a partir da concentração de 60% e, inibiu 100% dos esporos na concentração de 80 e 90%. Diferentemente do hidrolato de *L. alba*, as concentrações do hidrolato de *O. basilicum* inibiram apenas 33% dos esporos de *A. welwitschiae* na concentração de 90% (Figura 1).

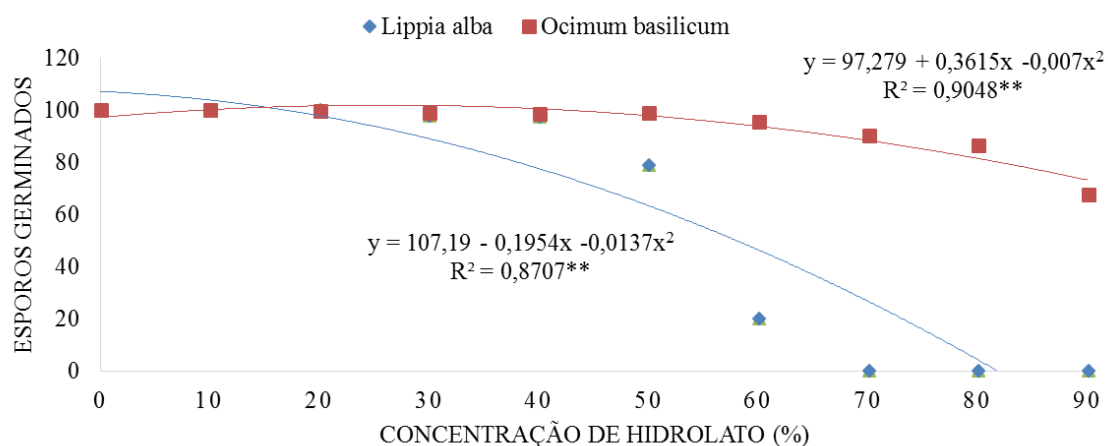


Figura 1. Esporos de *A. welwitschiae* germinados na presença dos hidrolatos de *L. alba* ()
 ◆*O. basilicum* (). ■*(p<0,01).

Os hidrolatos testados possuem ação antifúngica sobre outras espécies de *Aspergillus*. O hidrolato de *L. alba* inibe o *A. niger* em concentrações >250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Hey et al., 2018), o hidrolato de *O. basilicum* reduz o crescimento micelial de *A. parasiticus* (Özcan, 2005). Os resultados obtidos confirmam que hidrolatos testados apresentaram ação antimicrobiana contra o *A. welwitschiae* assim como os seus OEs (Capítulo 1/ Artigo 1), e que possuem potencial para utilização no controle do patógeno da podridão vermelha do sisal. É possível que, os mesmos componentes com ação antimicrobiana presente nos OEs, embora em quantidades diferentes, também estejam presentes nos hidrolatos. Smigielski et al. (2016) compararam as composições químicas do OE e hidrolato de *O. basilicum* constataram que ambos possuíam o metileugenol (45,8 e 33,4%, respectivamente) como componente principal. Hey et al. (2018) também analisaram a composição química do OE e hidrolato de *L. alba* e encontraram a carvona (41,6 e 92,7%, respectivamente) como componente principal para ambos.

O diâmetro das colônias de *A. welwitschiae* foi reduzido significativamente (p<0,01) pelos hidrolatos. O tratamento controle apresentou crescimento normal, atingindo 9 cm de diâmetro. O hidrolato de *L. alba* apresentou aumento do efeito inibitório com o aumento da concentração, obtendo inibição de 100% do crescimento micelial nas concentrações de 80 e 90%. Nas concentrações de *O. basilicum*, embora nenhuma tenha inibido totalmente o crescimento micelial do *A. welwitschiae*, observou-se diminuição

significativa com o aumento da concentração, obtendo inibição de 75% com a concentração de 90% (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Özcan (2005) na avaliação de diferentes hidrolatos sob o *A. parasiticus*. O hidrolato de *O. basilicum* proporcionou inibição do crescimento micelial de 42%, enquanto outros hidrolatos, como de *Pimpinella anisum* L. inibiu 100%.

Embora não seja totalmente esclarecida, as hifas de *A. welwitschiae* têm um papel de grande importância na infecção nas plantas de sisal. Ferimentos naturais no caule (causados pelas altas temperaturas ambientais) e os cortes das folhas para o desfibramento são apontados como vias de infecção para o *A. welwitschiae* (Silva et al., 2008). As hifas do patógeno colonizam todo o tecido caulinar, iniciando na epiderme e posteriormente seguindo para o cilindro vascular da planta (Duarte et al., 2018). A inibição do crescimento micelial de *A. welwitschiae* pelos hidrolatos apresenta potencial de controle preventivo para a podridão vermelha, pois ao aplicar no caule, sob a epiderme ou após o corte das folhas, os hidrolatos podem inibir o crescimento micelial e consequentemente evitar a infecção dos tecidos caulinares da planta pelo patógeno.

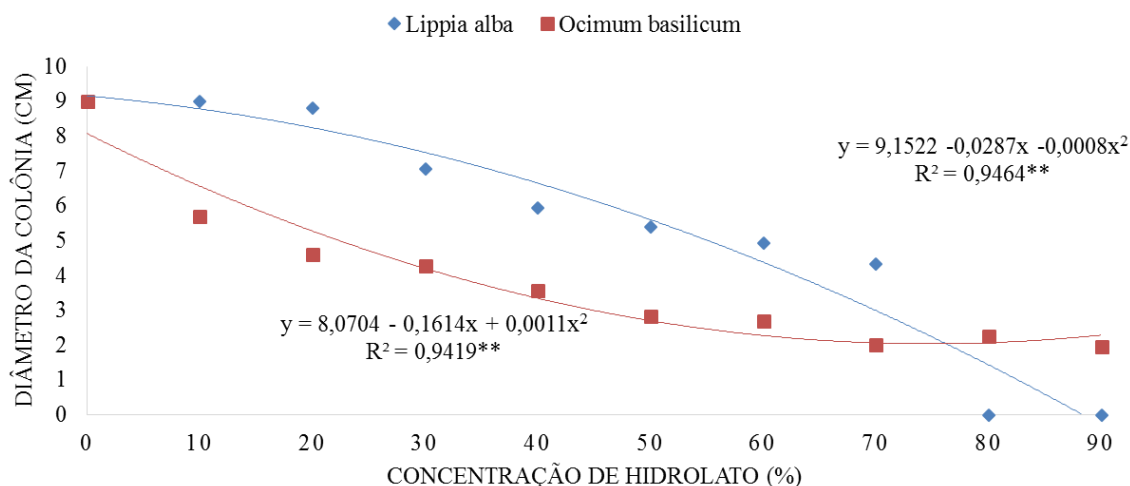


Figura 2. Diâmetro das colônias de *A. welwitschiae* crescidas no meio BDA com os hidrolatos de *L. alba* (◆) e *O. basilicum* (■). **($p < 0,01$).

A esporulação do *A. welwitschiae* também foi afetada pelos hidrolatos. Todas as concentrações dos hidrolatos conseguiram reduzir significativamente ($p < 0,01$) a produção

de esporos em relação ao tratamento controle que apresentou aproximadamente $4,5 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹. Em geral, a concentração de 40% para ambos os hidrolatos proporcionou a menor produção de esporos de *A. welwitschiae* sendo $1,1 \times 10^9$ e $0,8 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹ para *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente (Figura 3). Os hidrolatos podem proporcionar deformações nas estruturas reprodutivas do *A. welwitschiae* que pode reduzir o número de esporos produzidos, assim como os OEs (Capítulo 1/ Artigo 1) ou até mesmo interferir diretamente na formação dos esporos pela alteração da percepção de sinais fisiológicos responsáveis pela reprodução (Tzotzakis e Economakis, 2007).

Os esporos (conídios) são a principal forma de propagação de fungos do gênero *Aspergillus*. O *A. welwitschiae* produz uma alta quantidade de esporos com alta viabilidade e por serem leves são facilmente dispersos pelo ar. Nas áreas produtoras de sisal, no Nordeste brasileiro, os esporos de *A. welwitschiae* tem um papel importante da disseminação do patógeno, pois devido as suas características, eles podem ser levados desde uma planta para outra, como entre áreas produtoras. A redução da quantidade de esporos produzidos também é importante para o manejo da podridão vermelha do sisal, pois o menor número de esporos corresponde a menos fonte de inóculo e possivelmente reduzem as chances novas infecções (Agrios, 2005).

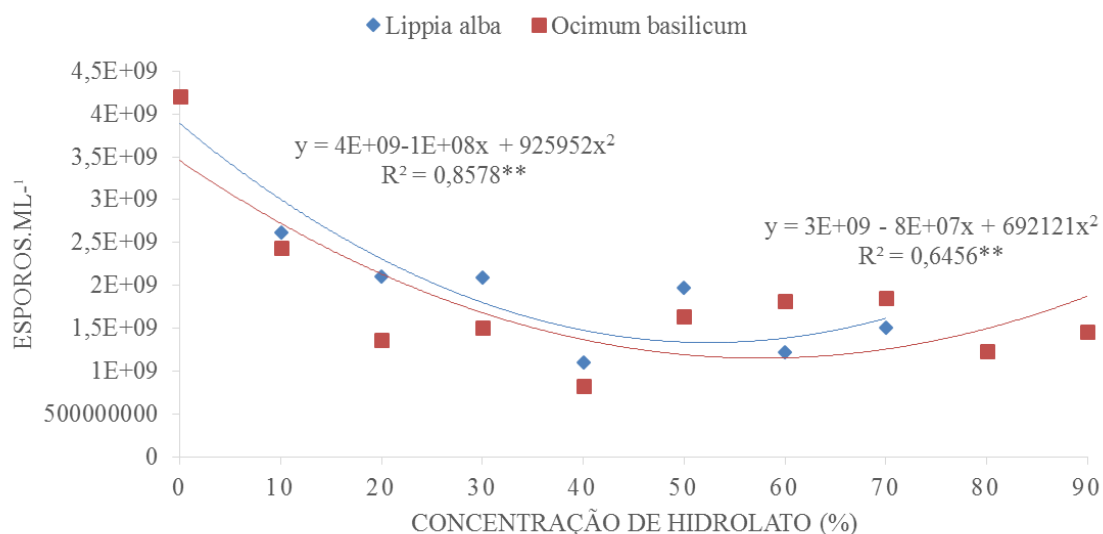


Figura 3. Produção de esporos por *A. welwitschiae* crescidas no meio BDA com os hidrolatos de *L. alba* (◆) e *O. basilicum*(■). ******($p < 0,01$).

O teste de patogenicidade e agressividade realizada com os esporos produzidos em meio de cultura com hidrolato revelou que a patogenicidade dos esporos não foi afetada, pois todas as mudas inoculadas com os esporos apresentaram sintomas da podridão vermelha do sisal (Figura 4 e 5). As mudas inoculadas com os esporos do tratamento controle (0%) (Figura 3) apresentaram caules totalmente apodrecidos com tombamento e morte das plantas (Figura 4 e 5). Nas mudas que receberam os esporos produzidos nas diferentes concentrações de ambos hidrolatos (Figura 3), em geral, os sintomas foram iniciais, houveram algumas mortes apenas nas concentrações mais baixas e os caules apresentaram a pigmentação vermelha característica da doença (Figura 4 e 5).



Figura 4. Patogenicidade de *A. welwitschiae* crescido em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de hidrolato de *L. alba*.



Figura 5. Patogenicidade de *A. welwitschiae* crescido em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de hidrolato de *O. basilicum*.

Ao contrário da patogenicidade, a severidade do *A. welwitschiae* foi afetada significativamente ($p < 0,01$) pelas concentrações dos hidrolatos. O índice da doença nas mudas do tratamento controle (0%) foi de 100%, confirmando o maior grau de severidade da doença que é a morte das plantas (Figura 4 e 5). Independente do hidrolato, as concentrações testadas obtiveram resultado semelhante na diminuição da agressividade dos esporos, obtendo inibição acima de 84% a partir da concentração de 20% (Figura 6). Dentre as concentrações, a 10% foi a que apresentou o maior índice da doença, sendo 30 e 50% para os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum*, respectivamente.

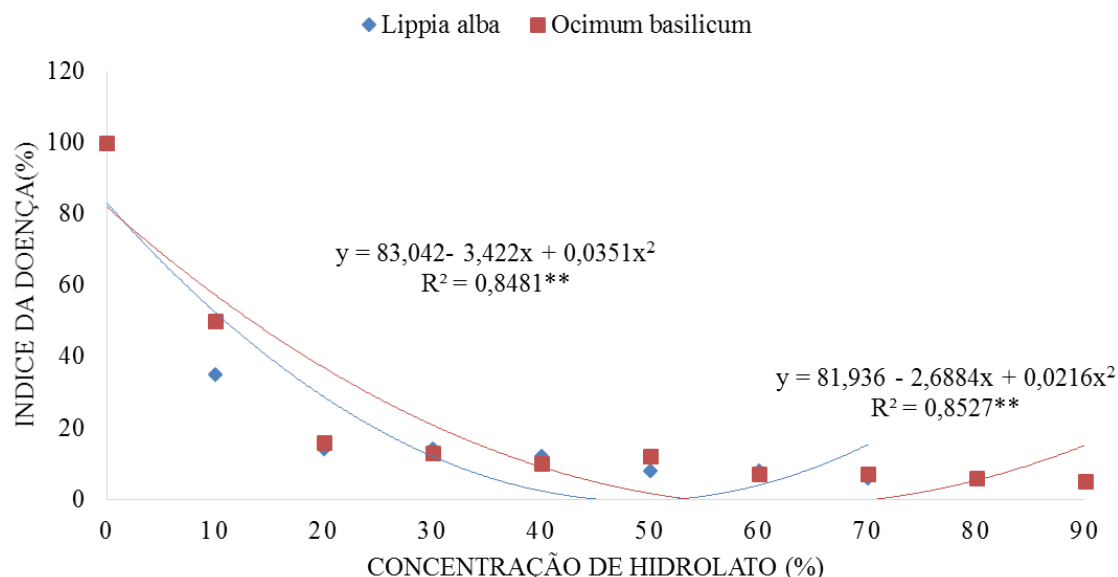


Figura 6. Índice da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com esporos produzidos em meio BDA com hidrolato de *L. alba* (◆) e *O. basilicum* (■). **($p < 0,01$).

A redução da agressividade dos esporos que foram produzidos em placas de Petri com meio de cultura com hidrolato, sugere que houve uma perda de características importante para o *A. welwitschiae*. Isso pode ter sido gerado pela condição de estresse do fungo devido ao meio de cultivo com hidrolato ou/e os compostos voláteis dos hidrolatos presente na placa podem ter afetado diretamente esporos. É possível que tenha ocorrido inibição ou diminuição da velocidade de produção de alguma enzima hidrolítica responsável pela colonização do tecido caulinar da planta. Para OEs e hidrolatos essas

questões ainda não foram investigadas, entretanto, por serem metabolitos secundários das plantas e de baixo peso molecular igual às fitoalexinas é possível que o efeito possa ser semelhante sob o fungo fitopatogênico. As fitoalexinas nos fungos podem causar desorganização dos conteúdos celulares e inibição de enzimas (Schwan-Estrada et al., 2005).

As mudas tratadas com os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum* e inoculadas com *A. welwitschiae* apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) no índice da podridão vermelha (Figura 7 e 8). As mudas que não foram tratadas com os hidrolatos apresentaram índice da doença de 100%, ou seja, apresentam caules totalmente apodrecidos e morreram durante o período de avaliação (Figura 7 e 8). Entretanto, nas mudas que foram tratadas, o índice foi reduzido em aproximadamente 94% nas concentrações acima de 70%, resultando em mudas apenas com sintomas iniciais da podridão vermelha como lesões iniciais no tecido do caule próximo ao tecido basal da folha, com cor avermelhado e sem morte durante o período de avaliação (Figura 7 e 8). Provavelmente, os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum* aplicados de maneira preventiva estimularam a produção de fitoalexinas nas mudas de sisal. Embora sejam inexistentes informações sobre a indução de fitoalexinas em plantas de sisal e o potencial indutor dos hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum*, considerável indução de fitoalexinas, por hidrolatos de outras plantas já foram demonstrados como, o hidrolato de *Baccharis trimera* que aplicado na concentração de 50% induziu a produção de fitoalexina em plantas de sorgo (Moura et al., 2014). Franzener et al. (2007) também constataram a indução significativa da produção de fitoalexina em plantas de sorgo por hidrolatos de *Helietta apiculata*, *Conyza canadensis*, *Cymbopogon nardus* em concentrações de 25%. Em outro estudo, plantas de *Phaseolus vulgaris* foram tratadas com tintura de *L. alba* na concentração de 20% e apresentaram menores valores do progresso da doença (AACPD) do crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Esse resultado foi atribuído aos maiores teores de polifenoxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em comparação com as plantas não tratadas, evidenciando uma possível indução de resistência (Vigo et al., 2009). É possível também que os resultados de controle da podridão vermelha do sisal pelos hidrolatos testados, também possam estar relacionados com o efeito dos hidrolatos diretamente ao *A. welwitschiae*, pois mesmo com intervalo de 24h entre o tratamento e a inoculação do patógeno, a superfície tratada pode possuir compostos capazes de inibir ou reduzir a

quantidade de esporos germinados e também diminuir o crescimento micelial como foi verificado nos experimentos *in vitro*.

Embora esse seja o primeiro relato de controle de doença de plantas por hidrolatos em mudas, outros autores também têm reportado o efeito de hidrolatos no controle de fungos fitopatogênicos, principalmente em frutos. Belabbes et al. (2017) relataram efeito protetor (100%) contra a podridão causada por *Penicillium expansum* em peras que foram tratadas com hidrolato de *Calendula arvensis*. Tabet Zatlá et al. (2017) reduziram em 70% a infecção de frutos de morango por *Botrytis cinerea* com a utilização de hidrolato (0,1 mL.L⁻¹) de *Daucus carota* subsp. *sativus* como tratamento preventivo. O hidrolato de *Thymus capitatus* (0,2 µg.mL⁻¹) foi aplicado preventivamente em frutos de *Citrus sinensis* e inibiu 100% o crescimento de micelial *P. italicum* (Tabti et al., 2014). Frutos de maçã foram preventivamente tratados com hidrolato de *Marrubium vulgare* na concentração de 0,15 mL.L⁻¹ e conseguiram reduzir em 85% a podridão causada por *P. expansum* (Zatlá et al., 2019).

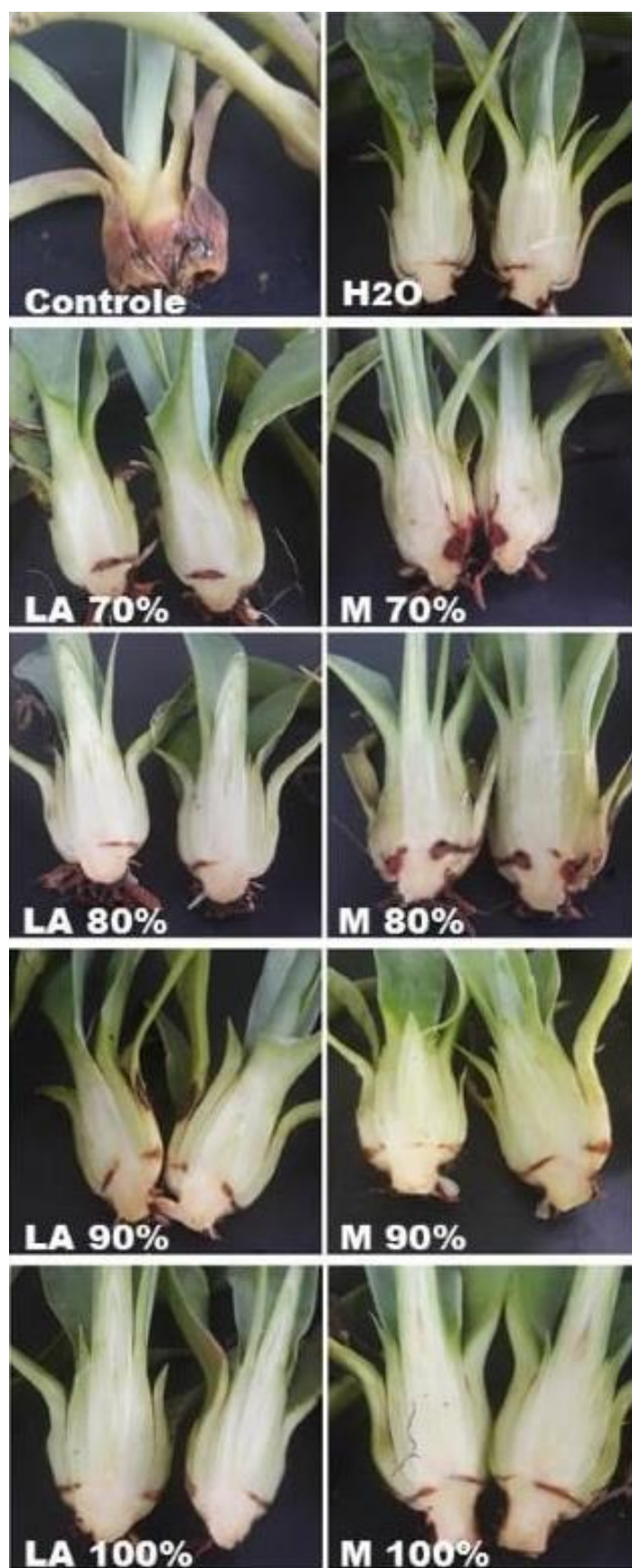


Figura 7. Mudas de sisal tratadas com hidrolatos de *L. alba* (LA) e *O. basilicum* (M) e inoculadas com *A. welwitschiae*.

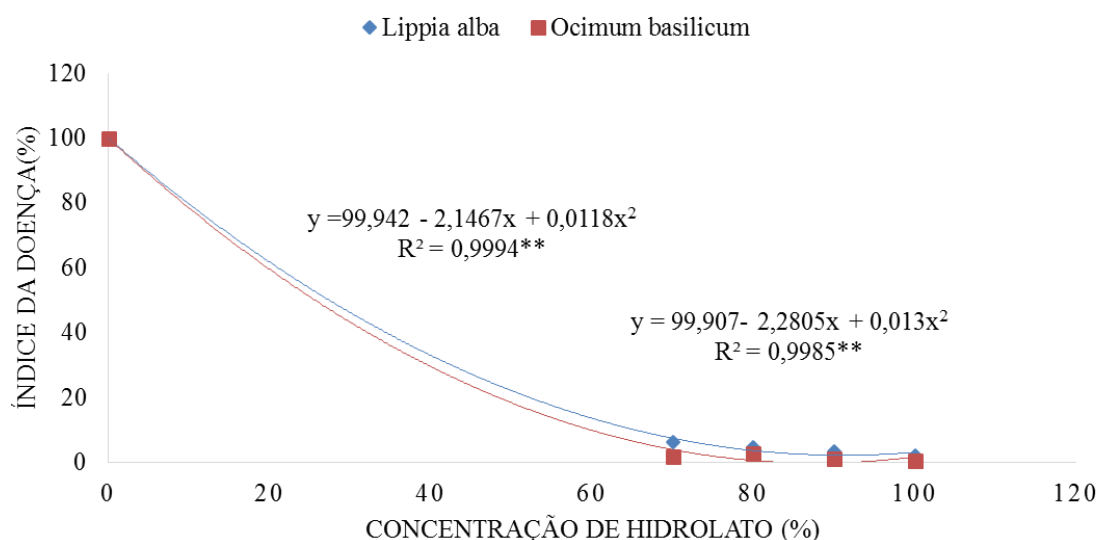


Figura 8. Índice da podridão vermelha do sisal em mudas tratadas com hidrolatos de *L. alba* (◆) e *O. basilicum* (■) e inoculadas com *A. welwitschiae*. $^{**}(p < 0,01)$.

Os resultados evidenciados neste estudo demonstram que os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum* podem ser utilizados como um produto preventivo no controle da podridão vermelha do sisal. Outro ponto que reforça a utilização dos hidrolatos no controle é que além de se obter uma quantidade 100 vezes maior em comparação com os OEs (obtida no processo de hidrodestilação), os hidrolatos testados inibiram *A. welwitschiae* em concentrações médias de 50% e controlaram a podridão vermelha em concentrações 70%, comprovando a viabilidade da utilização. Além disso, as espécies medicinais estudadas são de fácil acesso aos agricultores, pois a *L. alba* é uma espécie que cresce espontaneamente em regiões semiáridas permitindo que seja manejada juntamente com a cultura do sisal, enquanto que o *O. basilicum* é uma espécie condimentar de fácil cultivo.

Trabalhos futuros precisam ser conduzidos para testar o efeito dos hidrolatos sob condições de campo com mudas e plantas adultas, bem como a avaliação de estratégias

para aplicação dos hidrolatos, como o tratamento através da pulverização ou imersão nos hidrolatos no caso das mudas.

4. Conclusão

Os hidrolatos de *L. alba* e *O. basilicum* possuem efeito sobre o *A. welwitschiae* e aplicados preventivamente, controlam a podridão vermelha em mudas de sisal a partir da concentração de 70%.

5. Referências bibliográficas

ABREU, K. C. L. DE M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2010.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**: 5.ed. Academic Press, 2005.

BARBOSA, L. DE O. Podridão vermelha do sisal: Controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2019.

BELABBES, R. et al. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from western Algeria.

Chemistry and Biodiversity, v.14, e.1600482, 2017.

BOYRAZ, N.; OZCAN, M. Antifungal effect of some spice hydrosols. **Fitoterapia**, v. 76, n.7-88, p. 661- 665, 2005.

BOYRAZ, N.; OZCAN, M. Inhibition of phytopathogenic fungus by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n. 3, p. 238-242, 2006.

CLSI, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M38-A2. Wayne, (2008).

CLSI, 2015. Reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard standard, 10th ed, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M7-A10. Wayne, (2015).

COUTINHO, W.M. et al. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.6, p. 605, 2006.

DI VITO, M. et al. Monarda citriodora hydrolate vs essential oil comparison in several anti-microbial applications. **Industrial Crops and Products**, v.128, p. 206-212, 2019.

DUARTE, E.A.A. et al. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p, 1227, 2018.

FAOSTAT. (2020). Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. Retrieved Março 28, 2020, from: <http://faostat.fao.org/>

FRANZENER, G.S. M.F. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n. 1, p 29-38,2007.

Hamdi, A. et al. Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllum tuberculatu m*. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 440-447, 2017.

Hay, Y. O. et al. Evaluation of combinations essential oils and with evaluation of combinations essential oils and with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.6, n.3, p. 216-230, 2018.

MCKINNEY, H.H. A new system of grading plant diseases. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-218,1923.

MEIRA, R.M.S.A.; MARTINS, F.M. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore**, v.27, n.1, p.109-112, 2003.

MOURA, G. S. et al. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p. 309-315, 2014.

ÖZCAN, M. Effect of Spice Hydrosols on the Growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 Strain. **Journal of Medicinal Food**, v.8, n.2, p. 275-278, 2005.

R CORE TEAM (2016) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, n. 1-2, p.129-137, 2005.

SILVA, O.R.R.F. et al. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. Circular Técnica, n. 123, 2008.

SILVA, O. R. R.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Embrapa-CNPA. Campina Grande, Brasil, 1999.

SMIGIELSKI, K. B.; PRUSINOWSKA, R.; BEMSKA, J. E. Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils and Hydrolates from Basil (*Ocimum basilicum*L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, n.2, p. 492-498, 2016.

TABET ZATLA, A. et al. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. **Journal of Essential Oil Research**, v.29, n.5, p. 391-399, 2017.

TABTI, L. et al. Control of fungal pathogens of *Citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.87, p. 279-285, 2014.

TAVARES, C. S. et al. Bioproducts from forest biomass: Essential oils and hydrolates from wastes of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L. **Industrial Crops and Products**, v.144, 112034, 2020.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

VIGO, S.C. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

ZATLA, A. T. et al. Efficacy of essential oil and hydrosol extract of *Marrubium vulgare* on fungi responsible for apples rot. **Anti-Infective Agents**, v.17, 2019.

ARTIGO 3

**USO DE HIDROLATO DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown COMO NOVA
TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine)**

Uso de hidrolato de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como nova tecnologia na produção de mudas de sisal (*Agave sisalana* Perrine)

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000 Cruz das Almas, BA.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Resumo: A propagação do sisal ocorre na sua grande maioria de forma vegetativa, seja através de bulbilhos ou rebentos. A utilização de mudas de sisal com boa qualidade fitossanitária e nutricional é um fator importante para se obtenha alta produtividade. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do hidrolato de *L. alba* na produção e sanidade de mudas de sisal. Cento e vinte bulbilhos de sisal permaneceram imersos no hidrolato de *L. alba* nos tempos de 6, 12, 24 e 48h. A testemunha foi composta por 30 bulbilhos sem hidrolato (0h). Na sequência, os bulbilhos foram plantados e permaneceram em casa de vegetação por 240 dias. Após esse período, 15 mudas de cada tratamento foram utilizadas para avaliação de variáveis agronômicas e as outras 15 foram avaliadas com relação a resistência a podridão vermelha. As mudas de sisal tratadas com hidrolato de *L. alba* apresentaram maior altura (25-30 cm) em relação com as mudas sem hidrolato (0h) que obtiveram apenas 20 cm. O hidrolato também proporcionou mudas com caules entre 2,8-2,9 mm, enquanto as mudas do controle não ultrapassaram 2,58 mm. As mudas imersas por 48h se destacaram-se por apresentarem em média 12 folhas por planta e comprimento e largura de 25 e 4,3 cm, respectivamente. O volume de raiz foi maior nas mudas tratadas variando entre 19-21 mL. A massa fresca e seca (g) das mudas produzidas foi maior quando os bulbilhos permaneceram embebidos no hidrolato, principalmente, em intervalos de tempo superior a 25h. O índice da doença (%) da podridão vermelha foi de 100 % nas mudas controle (0h), resultando na morte de todas as plantas. A redução do índice da doença mostrou-se diretamente relacionada com o tempo de imersão no hidrolato, com redução significativa em aproximadamente 70% no intervalo de 48h. O hidrolato de *L. alba* proporcionou aumento no crescimento de mudas de sisal e maior resistência ao ataque de *A. welwitschiae*.

Palavra-chave: Erva-cidreira, promoção de crescimento, indução de resistência, podridão vermelha do sisal.

Use of hydrolate *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown as a new technology in the production of sisal seedlings (*Agave sisalana* Perrine)

Renata de Lima¹, Leonardo de Oliveira Barbosa¹, Franceli da Silva^{1,2}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000 Cruz das Almas, BA.

²Corresponding author: franceli.silva@gmail.com

Abstract: The propagation of sisal occurs mostly in a vegetative form, either through bulbils or shoots. The use of sisal seedlings with good phytosanitary and nutritional quality is an important factor to obtain high productivity. This work aimed to evaluate the effect of *L. alba* hydrolate on the production and sanity of seedlings of sisal. One hundred and twenty sisal bulbilli remained immersed in the hydrolate of *L. alba* at 6, 12, 24 and 48 hours. The control was composed of 30 bulbilli without hydrolate (0h). Then, the bulbils were planted and remained in a greenhouse for 240 days. After this period, 15 seedlings from each treatment were used to evaluate agronomic variables and the other 15 were evaluated for resistance to red rot. The sisal seedlings treated with *L. alba* hydrolate showed a higher height (25-30 cm) in relation to the seedlings without hydrolate (0h) that obtained only 20 cm. The hydrolate also provided seedlings with stems between 2.8-2.9 mm, while the seedlings of the control did not exceed 2.58 mm. Seedlings immersed for 48 hours stood out for presenting an average of 12 leaves per plant and length and width of 25 and 4.3 cm, respectively. The root volume was higher in the treated seedlings, varying between 19-21 mL. The fresh and dry mass (g) of the seedlings produced was greater when the bulbilli remained embedded in the hydrolate, mainly, in intervals of time greater than 25h. The disease index (%) of red rot was 100% in the control seedlings (0h), resulting in the death of all plants. The reduction in the disease rate was directly related to the time of immersion in the hydrolate, with a significant reduction of approximately 70% in the interval of 48 hours. The hydrolate of *L. alba* provided an increase in the growth of sisal seedlings and greater resistance to the attack of *A. welwitschiae*.

Keyword: Lemon balm, growth promotion, resistance induction, sisal bole rot disease.

Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma espécie suculenta caracterizada principalmente pelas fibras duras vegetais de suas folhas. A planta também vem sendo investigada e apresentando potencial como matéria-prima para produção de etanol (Yan et al., 2020). O cultivo do sisal ocorre na sua maioria em regiões áridas e semiáridas de países como Brasil, México, China, Tanzânia e Quênia (Yang et al., 2015; FAOSTAT, 2020). Nessas regiões, a cadeia produtiva do sisal emprega e gera renda para milhares de famílias e, em alguns casos é a única fonte de renda.

Em 2018, o Brasil se destacou no cenário internacional como o país com maior área plantada, com 91306 hectares e o maior produtor de fibra de sisal, com 80 mil toneladas, correspondendo a 40% de toda a fibra de sisal produzida no mundo (FAOSTAT, 2020). No Brasil, o cultivo do sisal se concentra no semiárido de Estados como Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, sendo esse último o maior produtor nacional, com 95,3% de toda a produção (IBGE, 2017). Apesar do Brasil se destacar entre os países produtores de sisal, o cultivo ocorre na sua grande maioria sem um manejo adequado, como espaçamento, adubação e o uso de mudas de boa qualidade sanitária e nutricional.

A propagação do sisal é predominantemente assexuada, seja por bulbilhos ou rebentos (Moreira et al., 1999). Os bulbilhos são originados de gemas que se encontram logo abaixo da linha de inserção das flores no escapo floral e em geral apresentam 6 e 10 cm de altura e apresentam 6 a 8 folhas e pequenas raízes adventícias (Silva et al., 2008). Os rebentos são gerados nos rizomas e são a forma mais utilizada pelos produtores no Brasil (Silva et al., 2008). As recomendações técnicas para os produtores é a utilização de rebentos com 40-50 cm altura e com 12-15 folhas (Silva et al., 2008). Para a produção de mudas a partir de bulbilhos é recomendada a permanência dos bulbilhos em viveiro por um ano antes do transplântio para o campo (Medina, 1963). Em contrapartida, as mudas de rebento estão disponíveis para o plantio, sendo necessário apenas a retirada da planta mãe, entretanto, evidências têm sugerido que esse tipo de muda é uma importante fonte de disseminação da podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Abreu, 2010). Além de se evitar a disseminação da principal doença da cultura do sisal, as plantas oriundas de mudas de bulbilho se destacam em relação as mudas de rebentos por apresentarem folhas com maior produção de biomassa, o que resulta em maior produção de fibra (Medina, 1963).

Neste contexto, existe a necessidade do desenvolvimento de tecnologias para a produção de mudas de sisal a partir de bulbilhos de forma que possa diminuir o tempo de produção além de garantir mudas com boa qualidade fitossanitária e nutricional. Na literatura existe carência de informação sobre a produção de mudas de sisal, além disso, muitos trabalhos são datados entre 1951-1963 (Medina, 1963; Souza et al., 2016).

A extração de óleos essenciais das plantas aromáticas por hidrodestilação permite a obtenção de um subproduto conhecido como hidrolato, hidrossol, água aromática ou água floral. São constituídos pela água de condensação do processo de destilação e por componentes polares, oxigenados, aromáticos, hidrofílicos e voláteis que formam ligações de hidrogênio com a água (D'Amato et al., 2018). Estudos demonstraram que alguns hidrolatos podem induzir a produção de fitoalexina que atuam na defesa da planta contra patógenos (Franzener et al., 2007; Vigo et al., 2009; Moura et al., 2014). Constatou-se que o uso de hidrolato de *Lavandula angustifolia* Mill. aumentou a atividade antioxidante e promoveu o crescimento de plantas de *Nicotiana benthamiana*, principalmente quando aplicado no estágio inicial do crescimento (Seong et al., 2019). O hidrolato de *Ipomea Carnea* aplicado na cultura do milho resultou em plantas maiores (Suradkar et al., 2016).

O hidrolato de *Lippia alba*, espécie que cresce espontaneamente em regiões semiáridas, apresenta ação antifúngica sobre fungo *A. welwitschiae* em experiências *in vitro* e *in vivo* (Capítulo 2/Artigo 2). A utilização do hidrolato de *L. alba* no tratamento de bulbilhos para a produção de mudas de sisal ainda não foi investigada. O uso do hidrolato pode ser uma estratégia viável na produção de mudas de sisal, pois o hidrolato pode atuar na ativação de mecanismos de defesas da planta e na promoção de crescimento, reduzindo o tempo de produção de mudas. O objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do hidrolato de *L. alba* no crescimento e sanidade de mudas de sisal.

Material e Métodos

Obtenção do hidrolato de *L. alba* e bulbilhos de sisal

Folhas e caules secos de *L. alba* (HURB 8794) foram utilizados para extração de óleo essencial por hidrodestilação em aparato do tipo Clevenger. O hidrolato, subproduto desse processo, foi coletado e armazenado em frasco âmbar sob-refrigeração até a sua utilização.

Os bulbilhos foram obtidos de plantas de sisal adultas em áreas produtoras no município de Conceição do Coité-BA. Em laboratório, os bulbilhos foram selecionados no tamanho de 10-12 cm de altura e com 4-6 folhas.

Implantação do experimento em casa de vegetação

Cento e vinte bulbilhos foram organizados em uma bandeja de plástico retangular com capacidade para 3L. Em seguida, foi adicionado sobre os bulbilhos 1,5L de hidrolato de *L. alba*. Os tratamentos consistiram nos intervalos de tempo que os bulbilhos permaneceram imersos no hidrolato, sendo 6, 12, 24 e 48h. A testemunha foi composta por bulbilhos que não foram imersos no hidrolato (0h). Cada tratamento foi composto por 30 repetições (bulbilhos).

Em cada intervalo, 30 bulbilhos foram retirados e plantados em sacos plásticos para mudas com capacidade para 3L, contendo uma mistura de solo e substrato comercial para produção de mudas na proporção 1:1. O experimento foi montado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas- Bahia, Brasil. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

Duzentos e quarenta dias após o plantio dos bulbilhos (8 meses) foi realizado a avaliação das mudas de sisal. Quinze mudas foram utilizadas para avaliar as variáveis agrônômicas como, altura (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas, comprimento e largura da folha (cm), comprimento (cm) e volume (mL) de raiz, massa fresca e seca da parte aérea e raiz (g), clorofila a e b.

Quinze mudas de cada tratamento (0, 6, 12, 24 e 48h) foram avaliadas com relação a resistência a podridão vermelha do sisal. No caule de todas as mudas foram feitos dois micro furos utilizando uma agulha hipodérmica. Em cada ferimento foi aplicado 100 µL de uma suspensão de esporos de *Aspergillus welwitschiae* (1×10^7 conídios mL⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Trinta dias depois da inoculação do *A. welwitschiae* foi avaliada a severidade da doença nas mudas. A avaliação da severidade ocorreu através do corte longitudinal do caule e foi aplicada a escala de notas

descrita por Barbosa (2019) composta por seis classes (0-5). Os dados de severidade foram transformados para índice da doença (%), conforme a equação proposta por McKinney (1923).

Análise de dados

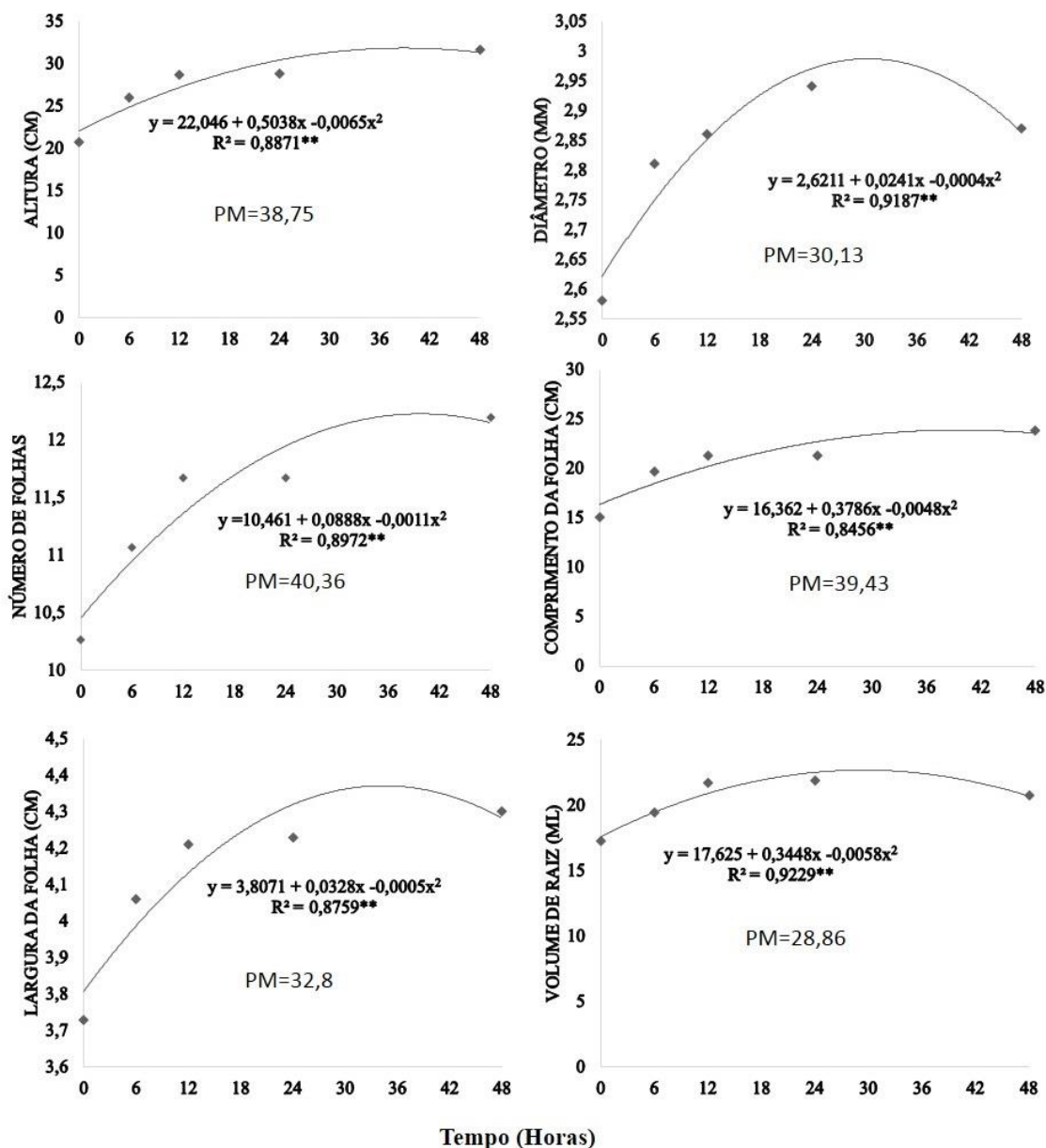
Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e para o caso de diferença significativa entre os tratamentos foi realizado a análise de regressão linear. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico R v. 3.0.2 (R Core Team, 2016).

Resultados e discussão

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis de clorofila A (média 55,2) e B (média 57,7) e comprimento das folhas (média 34,4 cm) pelo teste F da análise de variância ($p < 0,05$). Os bulbilhos imersos no hidrolato de *L. alba* resultaram em mudas de sisal com altura variando entre 25-30 cm, enquanto as mudas sem hidrolato apresentaram 20 cm (0 horas), com ponto máximo estimado de aproximadamente 39 h. (Figura 1). O diâmetro (mm) do caule das mudas não tratadas (2,58 mm) foi inferior ao das mudas que receberam o hidrolato (2,8-2,9 mm). O aumento no diâmetro dos caules esteve diretamente relacionado com o tempo dos bulbilhos no hidrolato, teve inicialmente um aumento logarítmico nos tempos de 6 a 24h e diminuindo posteriormente no intervalo de 48h. O ponto máximo estimado foi de 30 h (Figura 1). Os resultados encontrados nesse estudo estão superiores ao reportados por Souza et al. (2016) na avaliação de compostos orgânicos minerais na produção de mudas de sisal a partir de bulbilhos. As mudas de sisal produzidas no composto C5 (30% esterco + 30% farinha de rocha + 40% resíduo de sisal) apresentaram altura e diâmetro de 10,45 cm e 2,29 mm, respectivamente.

Embora a equação logarítmica de 2º grau ajustou melhor os dados, com R^2 variando entre 84-89%. O número, comprimento (cm) e largura (cm) das folhas das mudas de sisal foram maiores quando o intervalo de imersão no hidrolato foi de 48h, apresentando em média 12 folhas por planta e obtiveram comprimento e largura de 24,82 e 4,3 cm, respectivamente. Os pontos máximos estimados para essas três variáveis foram de 40, 39 e 32, respectivamente (Figura 1). O volume de raiz (mL) das mudas tratadas com hidrolato foi significativamente ($p < 0,01$) maior ao das mudas controle (17,33 mL). As mudas

tratadas apresentaram volume de raiz semelhante, variando entre 19-21 mL, com ponto máximo estimado de aproximadamente 29 h (Figura 1).

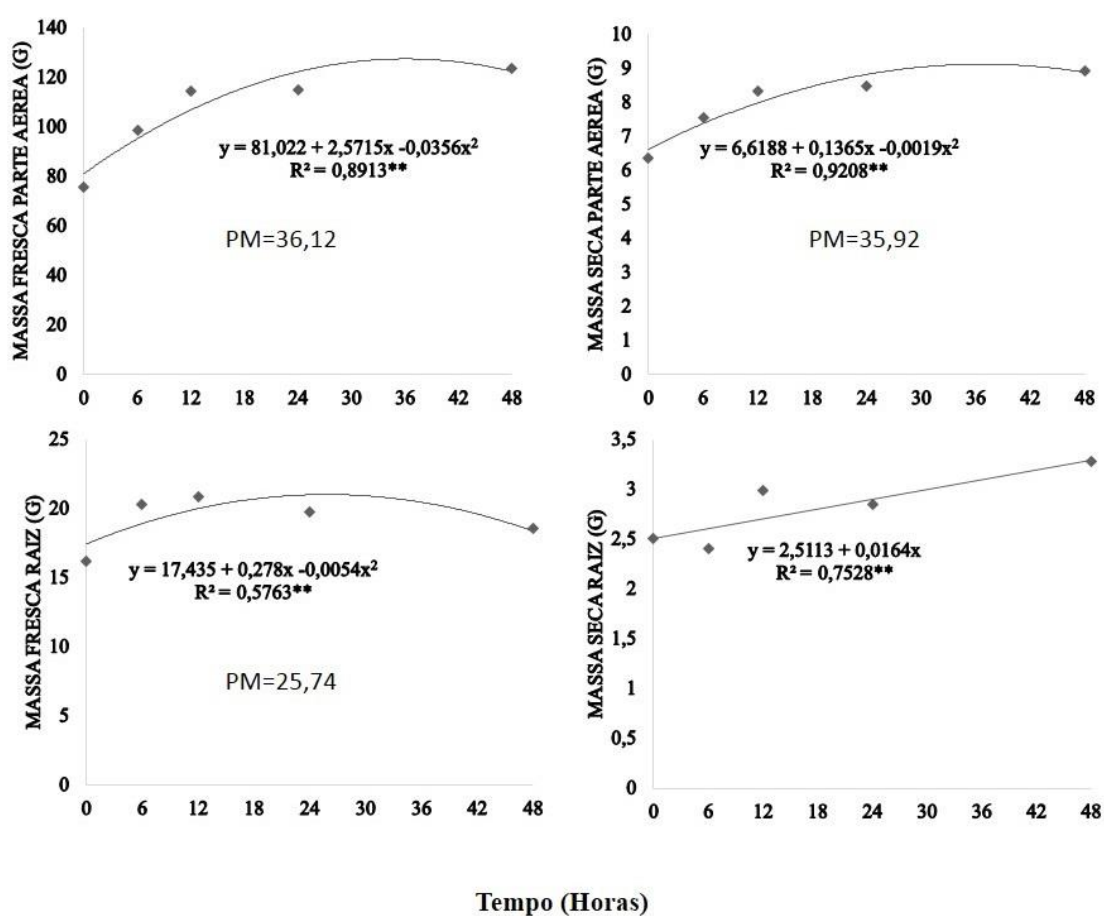


** (p<0,01) PM= ponto máximo

Figura 1. Altura (cm), diâmetro (mm), número de folha, comprimento e largura de folha (cm) e volume de raiz (mL) de mudas de sisal (*A. sisalana* Perrine) com 240 dias produzidas com hidrolato de *L. alba* em diferentes intervalos de imersão.

A massa fresca e seca (g) das mudas produzidas foi significativamente (p<0,01) maior quando os bulbilhos permaneceram imersos no hidrolato, principalmente, em

intervalos de tempo superiores às 25h. Nas mudas imersas em hidrolatos por 48h a quantidade de massa na parte aérea nas mudas foi maior, sendo aproximadamente 123 g e 9 g de massa fresca e seca, respectivamente (Figura 2 e 3). Além de proporcionar maior crescimento na parte aérea, o tratamento de 48h também resultou em maior quantidade de massa seca da raiz com 3,28g (Figura 2 e 3). Os valores de biomassa seca (parte aérea + raiz) das mudas produzidas com hidrolato são semelhantes aos obtidos por Souza et al. (2016), as mudas de sisal produzidas no composto C5 obtiveram biomassa seca de 9,96 g.



** (p<0,01) PM= ponto máximo

Figura 2. Massa fresca e seca da parte aérea e raiz (g) de mudas de sisal (*A. sisalana* Perrine) com 240 dias produzidas com hidrolato de *L. alba* em diferentes intervalos de imersão.



Figura 3. Mudanças de sisal (*A. sisalana* Perrine) com 240 dias produzidas com hidrolato de *L. alba* em diferentes intervalos de imersão.

Apesar das plantas oriundas de mudas de bulbilho se destacarem em relação às mudas de rebentos por apresentarem folhas com maior produção de biomassa e produção de fibra (Medina, 1963). Os agricultores optam pelas mudas de rebento pelo o fácil acesso as mudas e por estarem disponíveis para a realização do plantio ou replantio. Estudos epidemiológicos indicam que o uso de mudas de rebento é uma das principais causas de disseminação da podridão vermelha do sisal, uma vez que 70% dessas mudas já apresentam sintomas da doença (Abreu, 2010). Uma das principais dificuldades na utilização de mudas de bulbilhos é o tempo para que a muda alcance a altura de 40-50 cm (conforme recomendações técnica), que geralmente leva um ano (Medina, 1963; Silva et al., 2008). Nesse contexto, os resultados obtidos nesse estudo demonstram que o hidrolato de *L. alba* pode contribuir para redução desse prazo com a promoção de crescimento das mudas. Vale destacar que essa tecnologia ainda precisa ser ajustada, pois os resultados apresentados foram de mudas de bulbilhos que receberam o hidrolato uma vez na fase do plantio. Possivelmente com mais aplicações em intervalos quinzenais ou mensais os resultados sejam ainda expressivos.

A utilização de hidrolatos na promoção de crescimento de plantas tem sido investigado recentemente, entretanto os estudos têm demonstrado que a aplicação desse subproduto da hidrodestilação apresenta potencial para uso na agricultura (Suradkar et al., 2016; Seong et al., 2019). Em nosso estudo, independente do tempo de imersão, todos os intervalos obtiveram maiores médias para todas as variáveis analisadas em comparação com o controle (0h). Resultado semelhante foi encontrado por Suradkar et al. (2016) que testaram o hidrolato de *Ipomea Carnea* na cultura do milho e constataram que 5 mL do hidrolato proporcionou plantas com 48 cm de altura, enquanto as plantas controle apresentaram apenas 40 cm sob as mesmas condições. Seong et al. (2019) também reportaram que o hidrolato de *L. angustifolia* contribuiu para aumento na altura (14,43 cm), comprimento (11,37 cm) e largura (11,07 cm) das folhas de plantas de *N. benthamiana*, principalmente quando aplicado no estágio inicial de crescimento. De acordo com os autores, essa promoção de crescimento foi causada pelo aumento da atividade antioxidante das plantas tratadas com o hidrolato.

O índice da doença (%) da podridão vermelha foi de 100 % nas mudas controle (0h), resultando na morte de todas as mudas, com apodrecimento dos seus caules (Figura 4). A diminuição do índice da doença esteve diretamente relacionada com o tempo de imersão no hidrolato, com redução significativa ($p < 0,01$) em aproximadamente 70% no intervalo de 48h (Figura 4). O fato das mudas tratadas com o hidrolato não morrerem durante o período de 30 dias e apresentarem, na sua maioria, apenas sintomas iniciais da podridão vermelha sugerem um aumento na resistência ao *A. welwitschiae*, (Figura 4). Possivelmente as plantas tratadas ativaram mais rapidamente seus mecanismos de defesa contra o patógeno do que as plantas do controle. Barbosa (2019) reportou que a lignificação celular e a produção de compostos fenólicos são dois mecanismos de defesa do sisal. A via fenilpropanóide é responsável pela biossíntese desses dois mecanismos de defesa da planta (Schwan-Estrada et al., 2008). É provável que o hidrolato de *L. alba* tenha contribuído de alguma forma para a ativação dessa via metabólica. Efeito semelhante foi causado pelo hidrolato de *L. angustifolia* em *N. benthamiana* resultando numa maior expressão do gene para fenilalanina amônia liase (PAL), enzima mais importante no primeiro passo da via de síntese de fenilpropanóide (Seong et al., 2019).

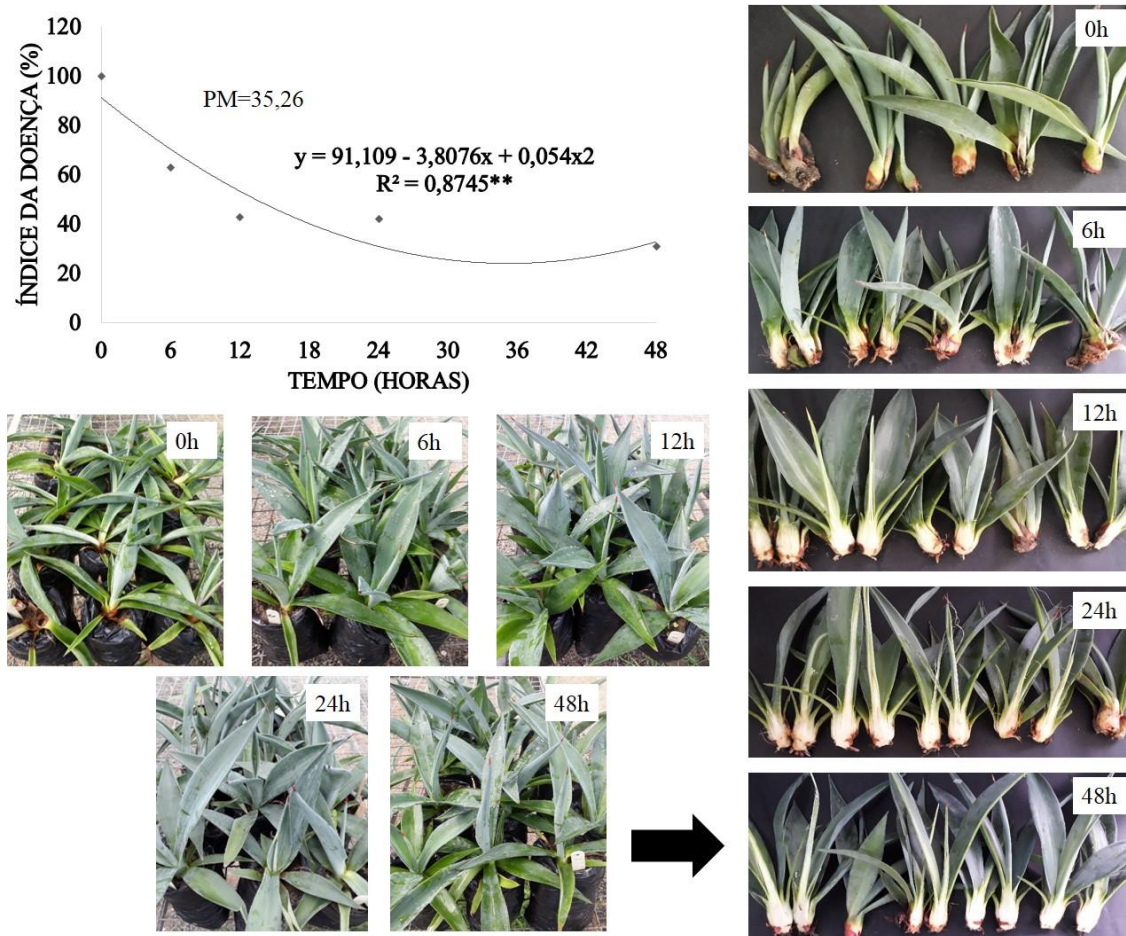


Figura 4. Índice da doença (%) da podridão vermelha em mudas de sisal com 240 meses produzidas com hidrolato de *L. alba* em diferentes intervalos de imersão. ** ($p < 0,01$), PM=ponto máximo.

O menor índice da doença nas mudas tratadas evidencia que mesmo sem nenhum tratamento direto sobre o *A. welwitschiae*, as plantas foram capazes de reduzir significativamente a agressividade do patógeno. Baseado nos resultados, provavelmente, as mudas produzidas com o hidrolato estariam menos susceptíveis ao ataque do *A. welwitschiae* ao serem transplantadas para o campo. Com base em estudos preliminares (Capítulo 2/Artigo 2) outra forma de aumentar a qualidade sanitária dessas mudas seria, antes de serem levadas para campo, a realização de uma aplicação do hidrolato de *L. alba* como um controle preventivo.

A utilização de hidrolato de *L. alba* na produção de mudas de sisal é uma estratégia totalmente viável, pois além de se obter uma grande quantidade de hidrolato no processo

de extração do óleo essencial na hidrodestilação, existe a facilidade da obtenção da própria planta. A *L. alba* é uma planta de fácil propagação vegetativa e que cresce espontaneamente em regiões semiáridas, permitindo que seja manejada nas entre linhas da cultura do sisal.

Conclusão

O hidrolato de *L. alba* promove o crescimento de mudas de sisal e contribui para maior resistência das plantas ao *A. welwitschiae*.

Referências bibliográficas

- ABREU, K. C. L. DE M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2010.
- BARBOSA, L. DE O. Podridão vermelha do sisal: Controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2019.
- D'AMATO, S. et al. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, v.86, p.126–137, 2018.
- FAOSTAT. (2020). Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. Retrieved Março 28, 2020, from: <http://faostat.fao.org/>
- FRANZENER, G.S. M.F. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n. 1, p 29-38,2007.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, janeiro de 2017**.
- MCKINNEY, H.H. A new system of grading plant diseases. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-218,1923.
- MEDINA, J.C. Multiplicação do sisal (*Agave sisalana* Perrine) por bulbilhos e rebentões e métodos de preparo e plantio das mudas. **Bragantia**, v. 22, n. unico, p. 559-574, 1963.

- MOREIRA, J. A. N.; BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, O. R. R. F. da. Botânica e morfologia do sisal. In: SILVA, O. R. R. F. da; BELTRÃO, N. E. de M. **O Agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, D. F.: Embrapa – SPI; Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1999.
- MOURA, G. S. et al. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p. 309-315, 2014.
- R CORE TEAM (2016) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F; LEITE, B; STANGARLIN, J.R; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2008.
- SEONG, E.S. et al. Effect of lavender hydrosol on antioxidant activity and growth in *Nicotiana benthamiana*. **Brazilian Journal of Botany**, v.42, p. 23–28, 2019.
- SILVA, O. R. R. F. et al. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. **Circular Técnica n. 123**, Embrapa, Campina Grande, PB, julho, 2008.
- SOUSA, C.S. et al. Potencial agrícola de um composto organomineral à base de resíduo de sisal, esterco e farinha de rocha para produção de mudas de sisal. **Scientia Plena**, v.12, n. 2, 2016.
- SURADKAR, V. B. et al. Effect of Hydrosol of *Ipomea carnea* Leaves, Flowers and *Lantana Camera* Leaves on the growth of wheat, maize and cotton plant. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.7, n.8, p.3477- 3479, 2016.
- VIGO, S.C. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.
- YAN, X. et al. Agave: A promising feedstock for biofuels in the water-energy-food-environment (WEFE) nexus. **Journal of Cleaner Production**, v.261, 2020.

YANG, X. et al. A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. *New Phytologist*, v. 207,n. 3, p. 491–504, 2015.