



**JHONATA LEMOS DA SILVA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus*,  
*Vernonia polyanthes* E FOSFITO DE POTÁSSIO  
NO CONTROLE DA ANTRACNOSE DO  
FELJOEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**JHONATA LEMOS DA SILVA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* (STEUD.) WATS.,  
*Vernonia polyanthes* Less. E FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE  
DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Paulo Estevão de Souza

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Jhonata Lemos da.

Óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro / Jhonata Lemos da Silva. – Lavras : UFLA, 2013.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. Indução de resistência. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Feijão - Controle alternativo de doenças. 5. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**JHONATA LEMOS DA SILVA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* (STEUD.) WATS.,  
*Vernonia polyanthes* Less. E FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE  
DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 02 de outubro de 2013.

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2013**

*Senhor meu Deus Eterno e meu Pai; Eu te dedico esta obra, fruto do meu trabalho, obrigado por tudo que tens feito em minha vida: por minha família, pelos meus amigos, pela alegria de viver, pelo ar que respiro, pelos dons que me deste e pelos relacionamentos que possibilitam que eu cresça a cada dia.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelo seu amor incondicional, pelo carinho, pelo cuidado com minha família, por nunca desistir de mim, por me amparar em meus momentos tristes, por me mostrar os melhores caminhos e ter-me feito sorrir quando eu só conseguia chorar.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade e contribuição no meu crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo e pelo auxílio desde os tempos de graduação.

Aos meus pais, Amadeu e Rosa, que sempre se esforçaram muito para que eu realizasse meus sonhos. Não faltaram grandes obstáculos nessa jornada, mas vocês sempre estiveram ao meu lado com uma presença confortante. Muito obrigado!

Aos meus avós, Pedro (*in memoriam*) e Lucrecia, pois mesmo com dificuldades me criaram e me colocaram na escola durante minha infância.

Às minhas lindas irmãs Andrenalina, Aleksandra, Chaiany e Carolaine pelo carinho, pelas várias brincadeiras e momentos de alegria.

À Sílvia Schutz pelo carinho, amor e atenção, por acreditar em mim desde quando eu era um calouro de Agronomia.

A toda minha família e amigos por acreditarem no meu potencial.

Ao Professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela oportunidade, orientação, paciência, por compartilhar comigo do seu amplo conhecimento e experiência, por ter ajudado a tornar-me um profissional melhor. Sua confiança no meu trabalho foi essencial na realização desta obra. Serei sempre grato!

Aos Professores Dr. Eduardo Alves e Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelas valiosas sugestões, pela disposição constante em colaborar com a melhoria deste trabalho.

À Camila Lage pela imensa ajuda nas várias etapas deste trabalho, obrigado pela paciência e atenção, sem a sua ajuda não teria conseguido.

À Professora Dr<sup>a</sup> Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelas análises de cromatografia.

Ao meu grande amigo Marcelo Freitas, pela agradável companhia, por ouvir as minhas ideias e pelo auxílio na condução dos experimentos.

À Natácia Soares e à Vanessa Passaglia pela amizade, pelo importante apoio oferecido e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Luizinho, Léia, Digo, Paulinho e Claubert pelo auxílio nos trabalhos do Horto para a obtenção dos óleos essenciais.

Aos amigos do DFP, Aurivan, Caio, Camila, Glauco, Humberson, Fernando, Kércio, Leônidas, Manoel, Maruzanete, Mateus, Mônica e Samuel pela agradável convivência e momentos de descontração.

À família Schutz, em especial Noemi Schutz pelos incentivos e auxílio desde os tempos da graduação.

À querida Eloísa Leite pelo auxílio no Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Pedro Ribeiro Júnior pelo auxílio nos testes de indução de resistência.

À Deila Botelho por aceitar participar da banca.

Aos amigos de república, Caio, Douglas, Francisco, Gabriel e João.

Aos demais Professores do DFP pelos conhecimentos transmitidos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta importante etapa da minha vida.

Muito obrigado!

*“As raízes do estudo às vezes são amargas, mas seus frutos sempre são doces”.*

**Aristóteles**



## RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (OEC), *Vernonia polyanthes* (OEV), e fosfito de potássio (FP) no controle da antracnose do feijoeiro causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. Para a avaliação do crescimento micelial e germinação de conídios foram realizados dois experimentos *in vitro*. Os tratamentos consistiram do OEC e OEV nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 1.000 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e FP a 5  $\text{mL L}^{-1}$ . Para avaliar a eficácia do OEC e OEV no controle da antracnose, plantas de feijoeiro foram pulverizadas com os mesmos tratamentos dos testes *in vitro*. Foram realizados experimentos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e determinação das enzimas peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL) para o estudo dos mecanismos de atuação dos produtos utilizados que se mostraram mais promissores no controle da doença. Verificou-se a total supressão do crescimento micelial e germinação do fungo com o OEC em concentrações superiores a 250 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. O OEC e OEV nas doses de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  reduziram a severidade da doença em 53,14 e 28,13%, respectivamente. Como componentes majoritários, foram identificados no OEC o geranial 46,86% e neral 33,4%, já para o OEV foram identificados o germacreno-D (42,19%), biciclogermacreno (17,23%) e o  $\beta$ -cariofileno (13,58%). As imagens de MEV mostraram que o FP, OEC e OEV reduziram o desenvolvimento micelial e a emissão de tubos germinativos. O FP e o OEC induziram aumento nos teores de POX e FAL nos tecidos do feijoeiro. Desta forma, o controle da antracnose do feijoeiro foi obtido tanto pela atividade antifúngica direta do FP e OEC como pela indução de enzimas de defesa.

Palavras-chave: Controle alternativo de doenças. *Colletotrichum lindemuthianum*. Indução de resistência. Microscopia eletrônica de varredura. *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

This study was conducted with the objective of evaluating the potential of *Cymbopogon flexuosus* (EOC) and *Vernonia polyanthes* (EOV) essential oils and potassium phosphate (PP) in controlling anthracnose in bean plants caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. In order to evaluate mycelial growth and conidial germination, two *in vitro* experiments were conducted. The treatments consisted of the EOC and EOV at concentrations of 0; 125; 250; 500; 1,000 and 2,000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , and FP 5ml  $\text{L}^{-1}$ . To evaluate the effectiveness of the EOC e EOV in the controlling anthracnose, bean plants were pulverized with the same treatments of the *in vitro* tests. We performed experiments with scanning electron microscopy (SEM) and the determination of peroxidase (POX) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzymes for studying the mechanisms of the products used which have proven most promising in disease control. We observed the complete suppression of mycelial growth and fungus germination with the EOC at concentrations superior to 250 and 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectively. The EOC and EOV at doses of 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  reduced the severity of the disease in 53.14 and 28.13%. As the major components, we identified in the EOC, the geranial 46.86% and neral 33.4%, while in the EOV we identified the germacrene-D (42.19%), bicyclogermacrene (17.23%) and  $\beta$ -caryophyllene (13.58%). The SEM images showed that the PP, EOC e EOV reduced mycelial growth and the emission of germination tubes. The PP and EOC induced an increase in the levels of POX and PAL in bean tissues. Thus, control of anthracnose was obtained both by direct antifungal activity of PP and EOC and by the induction of defense enzymes.

Keywords: Alternative diseases control. *Colletotrichum lindemuthianum*. Resistance induction. Scanning electron microscopy. *Phaseolus vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Plantas estudadas; A) <i>Cymbopogon flexuosus</i> e B) <i>Vernonia polyanthes</i> .....	25
Figura 2	Estrutura química do geranial e neral (citral), componentes majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	40
Figura 3	Estrutura química do Germacreno-D, Biciclogermacreno e $\beta$ -cariofileno.....	42
Figura 4	Efeito de diferentes concentrações (125, 250, 500, 100 e 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (OEC) (A), <i>Vernonia polyanthes</i> (OEV) (B), fosfito de potássio (FP), fungicida (FU), tween 20 e água destilada sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (...continua.....)	50
Figura 5	Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , às 4 horas após a inoculação.....	55
Figura 6	Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , às 8 horas após a inoculação.....	56
Figura 7	Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , às 16 horas após a inoculação.....	57
Figura 8	Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , às 48 horas após a inoculação.....	58

## LISTA TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	41
Tabela 2	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Vernonia polyanthes</i> .....	43
Tabela 3	Porcentagem da inibição do crescimento micelial (PIC) e germinação de conídios (PIG) de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> submetido a diferentes tratamentos com óleos essenciais, fosfito de potássio e fungicida .....	46
Tabela 4	Desdobramento dos graus de liberdade para a interação tripla dos tratamentos aplicados x épocas de coleta x plantas com e sem inoculação.....	60
Tabela 5	Atividade da peroxidase mM min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína em plantas de feijoeiro com e sem inoculação de <i>C. lindemuthianum</i> , no estágio V3/V4, coletadas aos 8, 10 e 13 dias após a pulverização com fosfito de potássio (FP), óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (OEC) e água destilada (H <sub>2</sub> O) .....	61
Tabela 6	Atividade da peroxidase mM min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína em plantas de feijoeiro sem inoculação de <i>C. lindemuthianum</i> , no estágio V3/V4, coletadas aos 1, 3, 6, 8, 10 e 13 dias após a aplicação de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (OEC) e água destilada (H <sub>2</sub> O).....	62

Tabela 7	Atividade da fenilalanina amônia-liase $\text{mMol min}^{-1} \text{mg}$ proteína <sup>-1</sup> em plantas de feijoeiro com e sem inoculação de <i>C. lindemuthianum</i> , no estágio V3/V4, coletadas aos 8, 10 e 13 dias após a aplicação de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (OEC) e água destilada (H <sub>2</sub> O) .....65
Tabela 8	Atividade da fenilalanina amônia-liase em $\text{mMol min}^{-1} \text{mg}$ proteína <sup>-1</sup> em plantas de feijoeiro sem inoculação de <i>C. lindemuthianum</i> , no estágio V3/V4, coletadas aos 1, 3, 6, 8, 10 e 13 dias após a pulverização de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (OEC) e água destilada (H <sub>2</sub> O) .....66

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
2.1	A cultura do feijoeiro .....	18
2.2	Antracnose - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav. ....	19
2.2.1	Controle da antracnose do feijoeiro .....	20
2.3	Controle alternativo de doenças .....	21
2.4	Óleos essenciais .....	23
2.5	Plantas estudadas .....	24
2.6	Fosfitos no controle de doenças de plantas .....	25
2.7	Indução de resistência .....	26
2.7.1	Peroxidase .....	27
2.7.2	Fenilalanina-amônia liase .....	28
2.8	A microscopia eletrônica aplicada no estudo de fungos e suas interações com plantas .....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1	Local de realização dos experimentos .....	30
3.2	Obtenção dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Steud.) Wats. e <i>Vernonia polyanthes</i> Less. ....	30
3.3	Análises químicas dos óleos essenciais .....	31
3.4	Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> .....	32
3.5	Avaliação da germinação de conídios .....	34
3.6	Preparo e condução das mudas de feijoeiro .....	35
3.7	Aplicação dos tratamentos .....	35
3.8	Atividade das enzimas peroxidases (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL) .....	36
3.9	Realização do experimento e inoculação .....	37
3.10	Coleta das amostras para microscopia .....	38
3.11	Preparo das amostras para MEV .....	39
3.12	Análises estatísticas .....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	Análises químicas dos óleos essenciais .....	40
4.2	Avaliação da inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	44
4.3	OEs e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação .....	52
4.4	Estudos da germinação e do desenvolvimento micelial <i>in vivo</i> de <i>C. lindemuthianum</i> .....	54

4.5	Análises bioquímicas da indução de resistência.....	59
5	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica e social por se constituir em um dos principais alimentos da população brasileira além de ser cultivado em grandes extensões de áreas empregando mão de obra durante todo o seu ciclo.

A produção nacional de feijão em 2012, considerando as três safras do produto, foi de 2.826.404 toneladas, a área colhida foi de 2.747.355 ha, resultando em uma produtividade de 1.028 Kg/ha. O feijoeiro é cultivado em todo o território nacional, sendo que os seis principais Estados (PR, MG, GO, CE, BA, SP) respondem por 70% do total produzido no País. Minas Gerais ocupa a segunda posição, produzindo 633.827 toneladas em 411.308 ha com produtividade de 1.541 Kg/ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, apesar disto, pode-se dizer que a produtividade média nacional é baixa comparada a países como Estados Unidos e China. Além das condições climáticas, as doenças são responsáveis pela baixa produtividade do feijão no Brasil.

A cultura do feijoeiro pode ser afetada por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides (VIECELLI et al., 2010). A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav. destaca-se como uma das mais importantes doenças do feijoeiro e apresenta ampla distribuição no Brasil. As lesões podem afetar desde cotilédones e hipocótilo de plântulas infectadas, levando-as à morte, até caule, pecíolos, limbo foliar e vagens de plantas adultas, comprometendo as sementes (POMPEU; DUDIENAS; ITO, 1992).

O controle da antracnose pode ser conseguido através de práticas culturais, resistência varietal e produtos químicos (BIANCHINI; MARINGONI;



CARNEIRO, 2005). Entretanto, o uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos aos seres vivos, ao meio ambiente e favorecido o surgimento de raças resistentes a essas substâncias químicas. Além disto, com o avanço do sistema de produção orgânica de plantas, há interesse na busca de novas práticas agrícolas que substituam os métodos convencionais de controle de doenças (RODRIGUES et al., 2007).

Neste contexto, atenção tem sido voltada para a utilização de substâncias alternativas aos fungicidas tradicionais, que sejam eficientes no controle de fitopatógenos e apresentem baixo impacto ambiental e risco aos consumidores. Essas substâncias extraídas das plantas podem tornar-se mais baratas que os fungicidas, estarem facilmente disponíveis ao pequeno agricultor e apresentarem baixo risco de intoxicação humana e de poluição do meio ambiente, podendo, em muitos casos, serem obtidas na própria propriedade agrícola (MARTINEZ, 2002). Todos esses atributos fazem com que estes produtos alternativos sejam adequados para a abordagem holística da agricultura biodinâmica e, sobretudo dos orgânicos (BETTI et al., 2009). Pois, enquanto os produtores convencionais de feijão dispõem de uma ampla gama de produtos químicos para o controle de doenças nas lavouras, as opções disponíveis aos agricultores que utilizam sistemas orgânicos de produção do feijão são reduzidas e pouco estudadas.

Diversos trabalhos mostram o potencial de óleos essenciais (OEs) de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas indicando a presença de moléculas com característica eliciadora (PEREIRA et al., 2012).

Hoyos et al. (2012) testaram 26 óleos essenciais em diferentes concentrações sobre *Pseudocercospora griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, desses, 25 demonstraram eficiência em inibir a germinação deste agente patogênico, atingindo níveis de inibição entre 80% e 100%.

*Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martini* inibiram a germinação de conídios em todas as concentrações. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que *C. citratus*, *C. martini* apresentaram ação antifúngica direta sobre *P. griseola*, causando graves danos na ultraestrutura celular dos conídios, como alterações no conteúdo citoplasmático, vacuolização, ruptura da membrana plasmática, da parede celular, penetração do óleo, condensação citoplasmática e diminuição das cristas mitocondriais.

Silva et al. (2012a) avaliaram o efeito dos OEs de *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea* como um tratamento preventivo para controlar ferrugem asiática da soja. Os autores observaram que todos os tratamentos inibiram em 100% a germinação de *Phakopsora pachyrhizi*. Nos testes *in vivo* observou-se que todos os óleos foram eficientes no controle da ferrugem da soja, para o tratamento preventivo, principalmente nas concentrações mais altas.

Desta forma, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats., *Vernonia polyanthes* Less. e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro causada por *Colletotrichum lindemuthianum*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta herbácea, dicotiledônea originária das Américas, pertencente à família Leguminosae, pode apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado, com ciclo anual variando de 60 a 120 dias (SANTOS; GAVILANES, 2006). O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*, que inclui *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*.

Na agricultura brasileira, o feijão é um dos produtos de maior importância econômica e social, por ser cultivado em grandes extensões de áreas e pelo emprego de mão de obra durante o ciclo da cultura. A produção nacional de feijão registrada em 2012, considerando as três safras do produto, foi de 2,8 milhões de toneladas, menor 19,3% quando comparada à obtida em 2011. Houve redução de 19,1% da área plantada e 25,4% na área colhida em comparação ao ano anterior. A cultura é cultivada em todo o território nacional, sendo que os seis principais Estados (PR, MG, GO, SP, CE e BA) responderam por 70,1% do total produzido no País. O Paraná manteve-se como principal produtor, com uma participação na produção de 24,0%, ou seja, 677.650 toneladas, redução de 16,9% à safra obtida em 2011. O Estado de Minas Gerais, 2º maior produtor nacional em 2012, participou com 22,4% totalizando 633.827 toneladas do grão (IBGE, 2013).

Em nível mundial, o consumo do feijão está distribuído nos continentes, nas seguintes proporções: Américas 43,2%, Ásia 34,5%, África 18,5%. Europa 3,7% e Oceania 0,1%. Os países em desenvolvimento são responsáveis por 86,7% do consumo mundial (SALVADOR, 2009).

A cultura é cultivada em três safras anuais sendo umas das poucas culturas cujo mercado é autorregulável, ou seja, se ocorrer excesso ou escassez de feijão, os produtores promovem ajuste da área plantada na safra seguinte compatibilizando, em curto prazo, a oferta com as necessidades de consumo.

Apesar de ser o maior consumidor e produtor mundial de feijão, a produtividade média do Brasil em 2012 foi de 1.028 Kg/ha (IBGE, 2013), valor muito abaixo da produtividade de países como os Estados Unidos e a China. Além das condições climáticas, as doenças são responsáveis pela baixa produtividade do feijão no Brasil.

## **2.2 Antracnose - *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav.**

A antracnose causada pelo fungo *C. lindemuthianum* destaca-se como uma das doenças mais importantes do feijoeiro por ocorrer em toda a parte aérea da planta e em condições favoráveis causar danos de 100% na produção (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). A doença tem sua origem, geralmente, pela utilização de sementes contaminadas ou pela presença de restos culturais infectados (PAULERT et al., 2009).

Em plantas suscetíveis, os sintomas podem aparecer em toda parte aérea e em especial nas vagens, comprometendo o rendimento da cultura e a qualidade do produto final. As lesões podem afetar cotilédones, hipocótilo, caule, pecíolos, limbo foliar e vagens de plantas adultas comprometendo as sementes (POMPEU; DUDIENAS; ITO, 1992).

Trata-se de uma doença cosmopolita, ocorrendo em vários países da Europa, Ásia, África, América e Austrália. No Brasil, ocorre nos principais Estados produtores, principalmente, quando predomina condições de alta umidade relativa do ar, temperaturas moderadas e chuvas prolongadas

(MARINGONI; BARROS, 2002). No estado de Minas Gerais, é uma das mais importantes doenças, principalmente nas regiões Sul e Zona da Mata devido à ocorrência de condições favoráveis a sua manifestação, provocando prejuízos consideráveis. Essa doença, além de provocar redução no rendimento da cultura, também pode afetar a qualidade do produto resultando na descoloração, deformação e enrugamento ou manchamento dos grãos.

### **2.2.1 Controle da antracnose do feijoeiro**

Para o controle da antracnose recomenda-se o uso de práticas culturais, resistência varietal e produtos químicos (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Dentre as práticas culturais, podem ser citadas a utilização de sementes de boa qualidade sanitária, a rotação de culturas, eliminação de restos culturais e a época de plantio. Para o controle da antracnose, a utilização de sementes sadias é uma prática que apresenta excelentes resultados. Essas sementes devem ser produzidas em condições de clima semiárido utilizando-se o sistema de irrigação por filtração (RAVA et al., 1981).

A utilização de cultivares resistentes à doença é, para o produtor, a forma mais prática e econômica de controle. Porém, devido à variabilidade apresentada pelo fungo, a obtenção de cultivares resistentes pelos programas de melhoramento é dificultada e, como consequência, os produtores acabam utilizando cultivares suscetíveis (PAULERT et al., 2009).

Outra forma de controle é com a utilização de produtos químicos, entretanto o uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos aos seres vivos, ao meio ambiente e favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos. Além disso, com o avanço do sistema de produção orgânica de plantas, há interesse na busca de novas práticas agrícolas que substituam os métodos convencionais de controle de doenças (RODRIGUES et al., 2007).

Assim, devido às consequências do uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura é necessário investigar o potencial de produtos alternativos para o controle de doenças de plantas.

### **2.3 Controle alternativo de doenças**

O controle das doenças na agricultura tem se intensificado, sendo realizado basicamente pelo uso de produtos sintéticos (VENTUROSO et al., 2011). Esses produtos, em curto prazo, auxiliam de maneira eficaz o agricultor no alcance de altas produtividades. No entanto, em longo prazo, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados à sociedade como um todo e para o meio ambiente podem tornar-se negativos devido à poluição causada pelos resíduos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

Nas últimas décadas, a exploração da atividade de compostos secundários tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos. Estes subprodutos das plantas como o extrato bruto e óleo essencial, possuem em sua composição substâncias com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (PEREIRA et al., 2008). Possuem ainda, a vantagem de serem praticamente inofensivas ao homem e ao meio ambiente, de menores custos, facilmente disponíveis aos agricultores, e em alguns casos podem, inclusive, superar os produtos sintéticos em sua ação antimicrobiana.

Devido à grande riqueza química das plantas medicinais que possuem princípios ativos, elas se tornam fontes de moléculas que podem ser utilizadas na defesa de plantas contra fitopatógenos (RODRIGUES et al., 2007). Estes compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como

alcaloides, terpenos, lignanas, flavonoides, cumarinas, benzenoides, quinonas, xantonas, lactonas, esteroides, fenóis e saponaninas.

A utilização de extrato bruto ou óleos essenciais visando à atuação destes compostos secundários sobre fungos fitopatogênicos é, frequentemente, empregado com sucesso. Foi verificado por Venturoso, Bacchi e Gavassoni (2011) que a utilização do extrato aquoso de cravo-da-índia inibiu completamente o crescimento micelial de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani*, *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp. Kuhn et al. (2006) observaram o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em mandioca por extrato de *Curcuma longa*.

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas e são constituídos basicamente de monoterpenos e sesquiterpenos, atualmente vários trabalhos são encontrados demonstrando a sua eficácia no controle de patógenos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Carneiro et al. (2007) observaram que o óleo de nim foi eficiente no controle do oídio em feijoeiro, principalmente quando aplicado seis horas antes da inoculação, reduzindo em até 65% o número de lesões nas folhas. Bastos (1997) demonstrou, *in vitro* e *in vivo*, a ação inibitória do óleo essencial de *Piper aduncum* contra *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e a inibição *in vitro* do crescimento micelial de vários fitopatógenos. Dias-Arieira et al. (2010) obtiveram inibições de crescimento micelial superiores a 75% quando expuseram o fungo causador da flor preta do morangueiro *Colletotrichum acutatum* ao óleo de nim nas concentrações acima de 0,5%.

Desta forma, o conhecimento da atividade biológica dos compostos presentes em plantas com relação à atividade eliciadora ou antimicrobiana poderá contribuir com o desenvolvimento de uma agricultura ecologicamente correta e sustentável, por meio da redução do uso indiscriminado de defensivos agrícolas no controle de fitopatógenos.

## 2.4 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, derivadas de terpenos provenientes da rota do ácido mevalônico ou dos fenilpropanoides (MORAIS, 2009). Apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade, isto os diferencia dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas. Possuem várias cores ou algumas vezes apresentam-se incolores, são pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água (SIMÕES; SPITZER, 1999). Os terpenos são constituídos de duas ou mais unidades isoprênicas. Cada molécula de isopreno é formada por cinco átomos de carbono (C5). De acordo com o tamanho da molécula, os terpenoides recebem denominação diferente: compostos formados por duas unidades isoprênicas (C10) são classificados como monoterpenos (mentol, limoneno, linalol, citral); os compostos formados por três unidades isoprênicas (C15) são classificados como sesquiterpenos ( $\alpha$ -selineno e  $\beta$ -cariofileno); compostos formados por quatro unidades isoprênicas (C20) são os diterpenos e os compostos formados por seis unidades isoprênicas (C30) são classificados como triterpenos (MORAIS, 2009).

OEs há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos OEs contra fitopatógenos (PEREIRA et al., 2008).



## 2.5 Plantas estudadas

*Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (Figura 1A) é uma planta pertencente à família Poacea. Em geral, recebe o nome internacional de capim limão da Índia Oriental (*East Indian lemongrass*). Efeitos antifúngicos e antibacterianos já foram constatados no óleo essencial dessa espécie, basicamente atribuídos ao citral.

Adukwu, Allen e Phillips (2012) observaram que o óleo essencial de *C. flexuosus*, mesmo em baixas concentrações (0,03; 0,06 %) foi eficaz em inibir o crescimento de cinco isolados de *Staphylococcus aureus* e a 0,125% o efeito foi bactericida. Além disso, o geranial (47%) e o neral (33%), componentes principais no óleo *C. flexuosus*, também mostraram uma zona de inibição de 8-6 cm sugerindo que podem ser estes responsáveis pela maior parte da atividade antibacteriana.

Singh (2010) avaliou *in vitro* a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos das folhas de *C. flexuosus*, *Ocimum sanctum*, *E. melliodora*, *Mentha arvensis* e *Citrus limetta* sobre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum*. O estudo revelou que o óleo de *C. flexuosus* foi mais potente e eficaz em menor concentração em comparação com os outros óleos essenciais estudados.

*Vernonia polyanthes* Less. (Figura 1B) conhecida popularmente como assa-peixe, é uma planta pertencente à família Asteraceae típica da Mata Atlântica. Silva et al. (2012b) avaliaram o potencial antimicrobiano de óleos essenciais e extratos vegetais de *V. polysphaera*, *E. uniflora* L., *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Matricaria chamomilla* L., sobre isolados de *S. aureus* e *E. coli*. Todos os óleos apresentaram eficiência antimicrobiana superando os extratos. Sendo que o óleo e extrato de *V. polyanthes* apresentaram melhor atividade antimicrobiana sobre *E. coli*.

Estudos sobre o potencial dessas duas espécies sobre *C. lindemuthianum* do feijoeiro ainda não foram relatados na literatura. Desta forma, testes são necessários para avaliação da eficácia dos óleos essenciais dessas plantas, que poderão tornar-se uma alternativa mais segura para o manejo da antracnose do feijoeiro.



Figura 1 Plantas estudadas; A) *Cymbopogon flexuosus* e B) *Vernonia polyanthes*

## 2.6 Fosfitos no controle de doenças de plantas

O fosfito  $P_2O_5$  (pentóxido de fósforo) é obtido da neutralização do ácido fosforoso  $H_3PO_3$  por uma base (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de amônio), sendo rapidamente absorvido pela planta e translocado pelo xilema e posteriormente pelo floema. Na reação com o hidróxido de potássio (KOH), tem-se a formação do fosfito de potássio.

Os fosfitos, devido a sua incompleta oxidação, apresentam maior solubilidade e absorção que os fosfatos, bem como provocam efeitos únicos sobre o metabolismo das plantas (LOVATT; MIKKELSEN, 2006). Seu efeito no controle de doenças tem sido observado contra vários fitopatógenos como *Plasmopara viticola* em videira, *Asperisporium caricae* em mamoeiro, *Phytophthora infestans* em tomateiro, *Verticillium dahliae* em cacauzeiro, etc.

Portanto, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da aplicação foliar do fosfito de potássio sobre a antracnose do feijoeiro e, dessa forma, ser recomendado como alternativa para o manejo integrado da antracnose do feijoeiro.

## **2.7 Indução de resistência**

A indução de resistência é um fenômeno muito comum na natureza, quando alguns tipos de estresses ou uma pré-infecção com um patógeno tornam as plantas mais resistentes à infecção subsequente por outros patógenos. Ao se considerar a necessidade de desenvolver novas alternativas de controle de patógenos, como parte do manejo integrado, que venham minimizar o impacto ao ambiente e ao homem pelo uso dos produtos químicos, a resistência induzida (RI) pode ser empregada, uma vez que pode ser obtida pela utilização de produtos naturais (PEREIRA et al., 2008). A RI pode ser definida como uma resistência dinâmica, baseada nas barreiras estruturais e bioquímicas da planta, induzida por inoculação prévia ou concomitante com um indutor (DI PIEIRO; GARDA, 2008).

A RI é dividida em duas categorias: a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Na primeira, a resistência se desenvolve sistêmica ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR)

ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar S-metil e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Já na RSI, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno, sem envolver a expressão de PR proteínas (VAN LOON et al., 1998). Outros mecanismos ativos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primários e secundários como, por exemplo, nas enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase.

### **2.7.1 Peroxidase**

As POXs estão envolvidas em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras (KAO, 2003).

O papel dessa enzima no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, aumento na produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana (RESENDE; SALGADO; CHSVES, 2003).

Na indução de resistência, as POXs são bastante estudadas devido a sua importância no processo de defesa, e, na maioria dos casos, o aumento da atividade está diretamente relacionado com a redução da severidade da doença. Iriti e Faoro (2003) observaram que plantas de feijoeiro pulverizadas com ASM demonstraram redução de 100% na ocorrência da ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* e, em testes histológicos, observaram alta atividade de peroxidase nas plantas que expressaram resistência.

### 2.7.2 Fenilalanina-amônia liase

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é fundamental na biossíntese de fenilpropanoides e participa da síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides (KUHNS et al., 2006). A FAL possivelmente é a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A FAL está localizada nos cloroplastos das células vegetais, principalmente nas membranas dos tilacoides e atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido transcinâmico e amônia. Em caupi (*Vigna unguiculata*), plântulas tratadas com ASM e inoculadas com *Colletotrichum destructivum* apresentaram aumento da resistência, comprovada com o aumento da enzima FAL (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001).

## 2.8 A microscopia eletrônica aplicada no estudo de fungos e suas interações com plantas

Nas interações planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência da planta hospedeira ocorre na célula, tanto do patógeno como da planta. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas, sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos (PEREIRA et al., 2008). Para se visualizar tais processos de infecção os microscópios de luz (ML), eletrônico de transmissão (MET) e eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições (ALVES et al., 2008). Esses microscópios são importantes ferramentas para o

entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses agentes (PERINA, 2011).

Neste contexto, Pereira et al. (2008) avaliando o efeito de concentrações de extrato de casca de café (ECC), óleo essencial de tomilho (OET) e acibenzolar-S-metil na germinação, no crescimento micelial e no desenvolvimento *in vivo* de *Cercospora coffeicola*, observaram que os conídios iniciaram a germinação quatro horas após a inoculação em todos os tratamentos, com exceção do tratamento constituído de OET, no qual a germinação foi pouco evidenciada nas observações ao MEV. Constataram ainda que nos tratamentos em que as plantas foram tratadas com ECC, os conídios de *C. coffeicola* originaram tubos germinativos mais desenvolvidos e em maior número, no entanto, nos tratamentos em que as plantas foram tratadas com OET, os conídios do fungo apresentaram baixa germinação, crescimento reduzido e extravasamento celular.

Deste modo, estudos com microscopia são necessários para o entendimento das interações entre plantas e fitopatógenos e os mecanismos de ação de produtos alternativos para o controle das doenças como os óleos essenciais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Doenças de Plantas, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural, Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Laboratório de Fitoquímica e Controle de Qualidade de Plantas Medicinais e em casa de vegetação, do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais.

#### 3.2 Obtenção dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. e *Vernonia polyanthes* Less.

Para obtenção dos OEs de *C. flexuosus* (OEC) e *V. polyanthes* (OEV) foram coletadas folhas destas espécies no mês de dezembro de 2012, às 9 horas da manhã, em um dia ameno e sem precipitação. A coleta foi realizada no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura pertencente à Universidade Federal de Lavras. A cidade de Lavras-MG localiza-se a uma latitude 21°14'43" sul e a uma longitude 44°59'59" oeste, estando a uma altitude de 919 metros.

Posteriormente as folhas foram levadas ao Laboratório de Fitoquímica e Controle de Qualidade de Plantas Medicinais, onde foram submetidas à extração do OE por arraste a vapor. A extração foi realizada em um destilador inoxidável para OEs Marconi MA480, empregando 1.000 g de folhas frescas, durante 90 minutos de destilação. Em seguida, o hidrolato foi coletado e o OE purificado por partição líquido-líquido, com três porções de 25 mL de diclorometano. As

frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o solvente evaporado, à temperatura ambiente, em capela de exaustão de gases até peso constante.

### 3.3 Análises químicas dos óleos essenciais

As análises da composição química foram realizadas por meio de uma amostra composta de alíquotas equivolúmetricas do óleo volátil das repetições de cada tratamento. As análises quantitativas do óleo foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de ionização de chama de hidrogênio (CG-DIC) em um sistema Agilent® 7890A equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme). O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, isotérmico por 1,5 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e injetado automaticamente no cromatógrafo empregando volume de injeção de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC) e o teor dos constituintes eluídos expressos como porcentagem de área relativa das áreas dos picos.

As análises qualitativas do óleo foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se um equipamento Agilent® 5975C, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com um intervalo de aquisição de massas de 40 - 400 *m/z*. As condições cromatográficas foram as mesmas empregadas nas análises quantitativas.



Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção calculados ( $IK_c$ ) com dados de espectros de massas e índices de retenção (IK) de literaturas (ADAMS, 2007) e por comparação dos espectros de massas. Os índices de retenção de Kovats ( $IK_c$ ) relativos a coinjeção de padrão de *n*-alcanos, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foram calculados com a aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

### **3.4 Avaliação da inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum***

A cultura pura do fungo *C. lindemuthianum*, raça 65, isolado 175 foi cedida e está depositada no Laboratório de Resistência de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. Foi obtida a cultura monospórica deste isolado, através do seguinte procedimento: repicou-se um disco de micélio do fungo para vagens de feijão inseridas no interior de tubos de ensaio, após quinze dias da repicagem foi adicionada água destilada esterilizada e após leve agitação dos tubos que continham os conídios formados nas vagens, foi realizada a obtenção da suspensão e calibragem para  $1,0 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Uma alíquota de 1 mL desta suspensão foi colocada na superfície do meio Ágar-água, contido numa placa de Petri, e em seguida espalhou-se cuidadosamente sobre o meio a suspensão de conídios. As placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de  $21 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação, e com auxílio de um microscópio de luz, foram visualizados os conídios germinados e esses transferidos individualmente para o centro de placa de Petri, contendo BDA. Procedeu-se à incubação durante quinze dias, sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade para a obtenção das culturas monospóricas.

No teste de inibição do crescimento micelial, os tratamentos foram adicionados ao meio BDA antes que esse fosse vertido nas placas e após a queda da temperatura para 40°C, de modo que as diluições finais do óleo essencial de *C. flexuosus* (OEC) e *Vernonia polyanthes* (OEV) atingissem as concentrações de 125, 250, 500, 1.000 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Nestes ensaios com OEs, foi adicionado Tween 20 a 0,1% (surfactante) ao meio BDA. Foi utilizada uma testemunha com Tween 20 a 0,1% para isolar o seu efeito. Foi testada uma dose padrão (5 mL L<sup>-1</sup>) testada em outros trabalhos de fosfito de potássio (FP). Como controle positivo foi utilizado o fungicida Trifloxistrobina + Tebuconazol (0,75  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) na dose recomendada para a cultura e como controle negativo água destilada esterilizada.

Após a solidificação do meio, os discos miceliais invertidos de 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *C. lindemuthianum*, foram colocados nos centros das placas de 90 mm de diâmetro, com os tratamentos descritos anteriormente. As placas foram criteriosamente lacradas com parafilme, identificadas e incubadas em BOD sob fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro a 25 °C.

As avaliações foram realizadas por medições diárias do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) 24 horas após a instalação do experimento e perdurou até o momento em que as colônias fúngicas cobriram 2/3 da superfície do meio de cultura.

A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) foi obtida por meio da fórmula:  $\text{PIC} = [(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] \times 100$ , para cada tratamento em relação à testemunha (BASTOS, 1997). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e cada parcela constituída por uma placa de Petri.

### 3.5 Avaliação da germinação de conídios

Para avaliar a inibição da germinação dos conídios, suspensões de conídios de *C. lindemuthianum* foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação em vagens de feijoeiro inseridas no interior de tubos de ensaio com meio BDA. Foi feita a deposição de 10 mL de água destilada esterilizada nos tubos, seguida de agitação. Após remoção da massa micelial mais conidial, foi feita a filtração em camada dupla de gaze esterilizada, obtendo-se uma suspensão de conídios, a sua concentração foi ajustada para  $1,15 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> com auxílio de um hemacitômetro.

Foram utilizadas placas de Petri de 60 mm de diâmetro, com meio Ágar-água (AA) 2%, no qual foram adicionados 1 mL dos tratamentos descritos no ensaio de crescimento micelial, espalhados sobre a superfície do meio com auxílio da alça de Drigalsky, e 1 mL da suspensão de conídios o qual também foi espalhado sobre o meio. Depois as placas foram levadas para câmara de germinação a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h, ao final de 24 horas foi feita a interrupção do processo germinativo utilizando-se lactoglicerol.

Foi realizada a avaliação da porcentagem de inibição da germinação, contando-se o número de conídios germinados e não germinados. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo independentemente do seu tamanho. O experimento foi realizado com seis repetições. As placas foram divididas em 4 quadrantes e contados 25 conídios por quadrante num total de 100 conídios para cada placa. A porcentagem de inibição da germinação (PIG) foi obtida por meio da fórmula:  $PIG = [(número\ de\ conídios\ germinados\ na\ testemunha - número\ de\ conídios\ germinados\ no\ tratamento) / número\ de\ conídios\ germinados\ na\ testemunha] \times 100$ , para cada tratamento em relação à testemunha (CELOTO et al., 2008).

### 3.6 Preparo e condução das mudas de feijoeiro

As mudas de feijoeiro utilizadas nos estudos de severidade, MEV e caracterização bioquímica foram obtidas pela semeadura da cultivar Pérola, suscetível a antracnose, em vasos de polietileno de 3 L, contendo terra\areia\esterco bovino (2:1:1) adubados com 5 g de NPK (4:14:18). Em cada vaso foram utilizadas cinco sementes de feijão e, após 15 dias da emergência, foi feito o desbaste mantendo-se apenas três plantas mais vigorosas e homogêneas.

### 3.7 Aplicação dos tratamentos

A fim de avaliar a eficácia dos óleos e fosfitos no controle da antracnose, plantas de feijoeiro com 21 dias após a semeadura, no estágio V3/V4, foram pulverizadas com os mesmos tratamentos dos testes *in vitro* até o ponto de escorrimento, utilizando-se pulverizador manual. Após 48 horas da aplicação, as plantas receberam uma suspensão de inóculo ( $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>) via pulverização e, em seguida, foram submetidas à câmara úmida por 14 horas com sacos transparentes. Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e cada parcela composta por seis plantas, dois vasos contendo três plantas cada.

Foram realizadas avaliações da severidade da antracnose a cada sete dias, com auxílio de escala de notas proposta por Godoy et al. (1997). Foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada tratamento, conforme Shaner e Finey (1977), por meio da seguinte equação:

$$\text{AACPD} = S ((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)$$

Em que:

AACPD = Área abaixo da curva de progresso da doença;

$y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima avaliação;

$t_i$  = tempo em dias da  $i$ -ésima avaliação.

### **3.8 Atividade das enzimas peroxidases (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL)**

Para determinar a atividade enzimática da peroxidase (POX) e fenilalanina-amônia-liase (FAL) foram selecionados os tratamentos mais promissores no teste de severidade (OEC 1000  $\mu\text{L}^{-1} \text{L}^{-1}$  e o FP 5  $\text{mL L}^{-1}$ ), também utilizou-se uma testemunha com água destilada, totalizando três tratamentos. Plantas de feijoeiro no estágio V3/V4 foram pulverizadas até o ponto de escorrimento e, depois de 7 dias, foram submetidas à inoculação conforme descrito anteriormente. O delineamento foi o de blocos casualizados com três repetições e parcela composta por três plantas.

Amostras de folhas de feijoeiro foram coletadas aos 1; 3; 6; 8; 10; 13 dias após pulverização dos tratamentos. As amostras foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise.

Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX e FAL, amostras de 0,2 g de tecido foliar fresco foram maceradas com  $\text{N}_2$  líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 1,3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a  $110.000 \times g$  por 30 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade das POX foi determinada pela oxidação do guaicol de acordo com a metodologia de Kar e Mishra (1976). Uma mistura de 90  $\mu\text{L}$  tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 30  $\mu\text{L}$  de guaicol 40 mM e 25  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 125 mM foi adicionada a 10  $\mu\text{L}$  do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em Leitor de Elisa a cada 10 seg durante 2 min após adição do extrato à mistura. O coeficiente de extinção molar de  $1,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade das POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955), a qual foi expressa em mM de purpurogalina produzida por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Durante todo o processo, os tubos da microcentrífuga foram cobertos com papel alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz.

A reação das FAL foi iniciada após a adição de 40  $\mu\text{L}$  do extrato a uma mistura contendo 110  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,8) e 50  $\mu\text{L}$  100 mM de *L*-fenilalanina. A mistura da reação foi incubada em Leitor de Elisa a 37 °C durante 10 minutos. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 280 nm e o coeficiente de extinção molar de  $5.000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965) foi utilizado para calcular a atividade das FAL, a qual foi expressa em  $\text{mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

### 3.9 Realização do experimento e inoculação

Para a avaliação da germinação e do desenvolvimento micelial de *C. lindemuthianum in vivo*, foram utilizadas plantas de feijoeiro da cultivar Pérola com 21 dias após a semeadura no estágio V3/V4, cultivadas conforme descrito anteriormente.

Foram utilizados os melhores tratamentos do teste de severidade OEC e OEV a  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$  e FP  $5 \text{ mL L}^{-1}$ , além da testemunha com água destilada. As

plantas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual e, dois dias após a aplicação, foram coletadas sete folhas de cada tratamento, destacando-se folhas do terceiro trifólio. Bandejas plásticas previamente desinfetadas com álcool foram preparadas para a recepção das folhas. No fundo das bandejas foram colocadas esponjas de látex laminadas e sobre as mesmas foram colocadas duas folhas de papel *germitest* umedecidas com água destilada.

Em seguida, foram desenhados seis círculos de 1 cm de diâmetro com caneta de marca permanente na superfície abaxial das folhas, próximos às nervuras e, em seguida, as folhas foram acomodadas nas bandejas. No centro de cada círculo, foram depositados 25 µL da suspensão de  $1,5 \times 10^3$  conídios de *C. lindemuthianum* mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente e dispostas em câmara de crescimento a 25 °C, até o final das coletas.

### **3.10 Coleta das amostras para microscopia**

As coletas das amostras observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foram realizadas nos tempos de 4, 8, 16 e 48 horas após a inoculação por meio de cortes circulares de 5 mm de diâmetro, feitos com bisturi, dentro de cada círculo onde foram efetuadas as inoculações. Os fragmentos foram colocados em microtubos de 1,5 mL contendo fixador (Karnovsky's modificado) e, em seguida, armazenados em geladeira, a 4 °C. O preparo e a observação das amostras em MEV foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise-Ultraestrutural de acordo com Pereira et al. (2008).

### **3.11 Preparo das amostras para MEV**

Depois de imerso em solução fixativa (Karnovsky's modificado), pH 7,2, por um período mínimo de 24 horas, oito fragmentos de cada tratamento foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato de 0,05 M e lavados três vezes durante 10 minutos. As seções foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1,0 % em água por 1 hora, lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes). Após essa desidratação, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 0,50, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 10 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 12.

### **3.12 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as comparações de médias realizadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade, para os fatores qualitativos, e análises de regressão para fatores quantitativos por meio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises químicas dos óleos essenciais

Os teores do OEC e OEV foram de 1,273 e 0,02 % respectivamente. Pelos dados descritos na Tabela 1, nota-se que foram identificados 19 constituintes, determinando-se um percentual acima de 97% da composição química do OEC, com a predominância do geranial 46,86% e neral 33,4% chamados de citral. No citral, reassalta-se quimicamente que o geranial possui uma ligação dupla conjugada à carbonila em configuração E, e o neral apresenta ligação dupla conjugada à carbonila aldeídica, em configuração Z (Figura 2). O citral é uma substância amplamente encontrada na natureza, especialmente nas várias espécies de *Cymbopogon* spp.

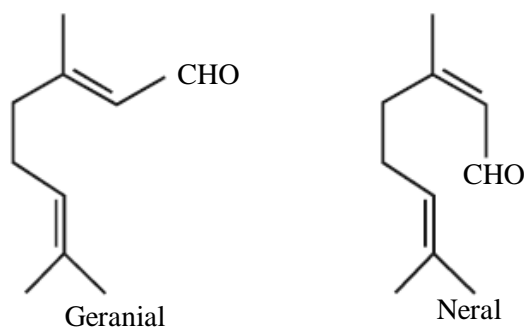


Figura 2 Estrutura química do geranial e neral (citral), componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*

Adukwu, Allen e Phillips (2012), por meio da CG-EM, identificaram 10 componentes do OEC e constataram os mesmos componentes majoritários encontrados neste trabalho: o geranial (47%) e o neral (33%). Já Anaruma et al. (2010), por meio da mesma técnica, identificaram 30 componentes e observaram

que os componentes majoritários deste óleo eram o transgeraniol (27,02%), citronelal (23,3%), nerol (13,47%), geraniol (12,6%) e neral (9,64%).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon flexuosus*

Constituintes	IR <sup>a</sup>	Área relativa (%)
Metil-heptenona	883	1,01
Mirceno	988	0,72
$\beta$ -ocimeno	1020	0,21
Linalol	1098	2,47
Exo-isocitral	1144	0,4
Citronelal	1152	0,21
Z-isocitral	1164	1,42
Não identificado m/z=152	1182	2,01
Estragol	1198	0,58
N-decanal	1205	0,36
Neral	1243	33,40
Geraniol	1254	1,14
Geraniol	1273	46,86
Não identificado m/z=168	1339	1,01
Não identificado m/z=168	1375	1,45
Acetato de geraniol	1384	3,08
<i>Trans</i> -cariofileno	1420	0,39
Ar-curcumeno	1484	0,31
$\Delta$ -curcumeno	1496	0,34
Óxido de cariofileno	1583	0,24
Total identificado (%)		97,69

IR = Índice de retenção (ADAMS, 2007), % = porcentagem do componente.

<sup>a</sup>Índice de retenção da série *n*-alcanos (C8-C20) em coluna HP-5M5.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, observa-se que foram identificados 21 constituintes no OEV, determinando-se um percentual acima de 97% da composição química deste OE. Os componentes majoritários foram germacreno-D (42,19%), biciclogermacreno (17,23%),  $\beta$ -cariofileno

(13,58%) e o  $\alpha$ -humuleno (7,84) (Figura 3). Poucos estudos reportam a constituição química do OE de espécies de *Vernonia* spp. Maia et al. (2010) analisaram os componentes majoritários dos OEs de duas espécies de *Vernonia* spp. Constatando que para o OE de *V. brasiliiana* os componentes principais foram o (*E*)-cariofileno (36,7%), germacreno-D (35,5%) e o  $\alpha$ -humuleno (11,7%). Para *V. remotiflora* o (*E*)-cariofileno (42,2%) e o biciclogermacreno (20%) foram os componentes majoritários. Diferenças foram encontradas no número de constituintes e na % da área relativa dos componentes químicos deste trabalho com os da literatura. Essas diferenças podem estar relacionadas a condições edafoclimáticas e ecológicas. Por exemplo, Marco et al. (2007) observaram que os componentes do OE de *C. winterianum* são afetados pela época de coleta e espaçamento entre plantas, sendo o teor de geraniol superior em plantas colhidas quatro meses após o plantio.

Desta forma, por meio da cromatografia foi possível identificar os constituintes dos OEs, esta é uma etapa essencial para a prospecção de novos produtos naturais recomendados para o manejo de doenças.

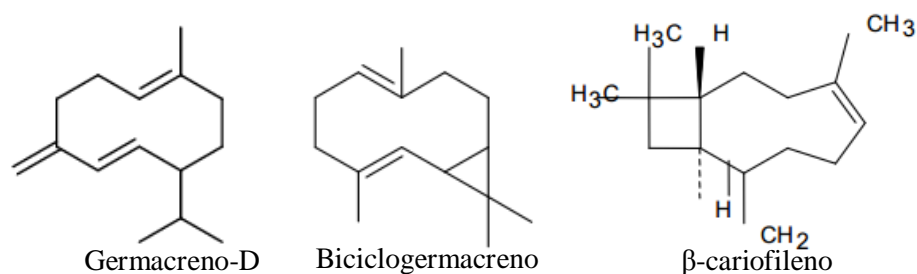


Figura 3 Estrutura química do Germacreno-D, Biciclogermacreno e  $\beta$ -cariofileno

Tabela 2 Composição química do óleo essencial das folhas de *Vernonia polyanthes*

Compostos	IR <sup>a</sup>	Área relativa (%)
$\alpha$ -pineno	830	0,24
$\beta$ -pineno	874	2,06
$\beta$ -terpineno	985	0,11
Ocimeno	994	0,35
<i>E</i> -dimetoxicitral	1338	0,58
Ciclosativeno	1377	2,34
Cicloisosativeno	1385	1,74
Copaeno	1393	1,96
$\beta$ -cariofileno	1421	13,57
Gurjuneno	1430	0,49
$\alpha$ -humuleno	1455	7,84
<i>cis</i> -cadin-1(6), 4-dieno	1462	1,96
Germacreno-D	1484	42,18
Biciclogermacreno	1498	17,23
Germacreno A	1506	0,77
( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farneseno	1509	0,91
$\gamma$ -cadineno	1515	0,42
$\delta$ -cadineno	1524	1,13
Espatulanol	1578	0,38
Óxido de cariofileno	1584	0,84
$\alpha$ -muurolol	1642	0,22
$\alpha$ -cadinol	1655	0,20
Total identificado		97,62

IR = Índice de retenção (ADAMS, 2007), % = porcentagem do componente.

<sup>a</sup>Índice de retenção da série *n*-alcanos (C8-C20) em coluna HP-5M5.

#### 4.2 Avaliação da inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*

Os resultados da análise de variância indicaram diferenças significativas na porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e germinação de conídios (PIG) de *Colletotrichum lindemuthianum* em virtude do aumento das concentrações de OEs utilizadas (Gráfico 1). Observa-se na Figura 4 que OE de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) reduziu o diâmetro da colônia de *C. lindemuthianum* logo a partir da menor concentração ( $125 \mu\text{L L}^{-1}$ ).

Por meio da equação de regressão que apresentou comportamento quadrático, pode-se verificar a total supressão do crescimento micelial do fungo com a utilização de concentrações superiores a  $615 \mu\text{L L}^{-1}$  com o OEC (Gráfico 1). O óleo essencial de *Vernonia polyanthes* (OEV) quando adicionado ao meio BDA apresentou atividade antifúngica inferior ao OEC, resultado em uma PIC de 51% na maior concentração utilizada (Gráfico 1B). A concentração capaz de inibir o crescimento micelial do fungo em 50% foi estimada em 162 e  $1918 \mu\text{L L}^{-1}$ , para OEC e OEV, respectivamente.

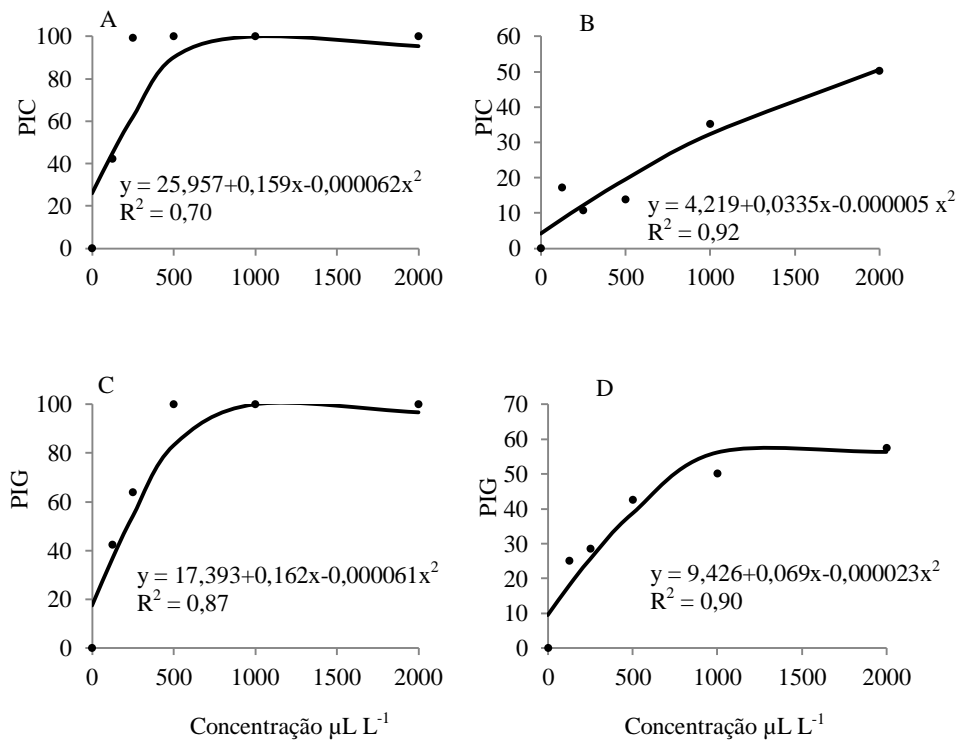


Gráfico 1 Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e germinação de conídios (PIG) de *Colletotrichum lindemuthianum* submetido a diferentes concentrações (0, 125, 250, 500, 100 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (A e C) e *Vernonia polyanthes* (B e D)

Nota: Dados transformados para  $\sqrt{x} + 1$ .

A PIG apresentou comportamento quadrático, aumentando na medida em que as concentrações do OEC e OEV se elevaram. O OEC a partir da concentração de 689  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi capaz de inibir totalmente a germinação de *C. lindemuthianum* (Gráfico 1C). Com relação ao OEV a máxima PIG (61%) foi obtida com a dose de 1520  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Gráfico 1D). A concentração capaz de inibir

a germinação de pelo menos 50% dos conídios foi estimada em 220 e 850  $\mu\text{L L}^{-1}$  para o OEC e OEV, respectivamente.

Na Tabela 3, está sendo mostrado o efeito do fosfito de potássio (FP), fungicida (FU), tween 20 e BDA puro (Testemunha) com as doses dos OEs que demonstraram maior atividade antifúngica. Pode-se verificar maior atividade antifúngica com o FT e OEC que inibiram totalmente o crescimento micelial e germinação do fungo diferindo significativamente do fungicida. A melhor concentração do OEV apresentou um nível intermediário de PIC e PIG diferindo do tween 20 e testemunha que não diferiram significativamente.

Tabela 3 Porcentagem da inibição do crescimento micelial (PIC) e germinação de conídios (PIG) de *Colletotrichum lindemuthianum* submetido a diferentes tratamentos com óleos essenciais, fosfito de potássio e fungicida

Tratamentos	PIC	PIG
FP	100 a	100 a
OEC 1000	100 a	99,13 a
Fungicida	76,08 b	93,3 b
OEV 2000	50,21 c	50,1 c
Tween 20	0,64 d	0,4 d
Testemunha	0 d	0 d
CV(%)	5,04	4,52

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para  $\sqrt{x + 1}$ .

Após o fim das análises de crescimento micelial, objetivando verificar se os tratamentos haviam apresentado ação fungicida ou fungistática sobre o fungo, foram retirados os discos de micélio do meio de cultura dos tratamentos que apresentaram PIC de 100% e repicados para placas com BDA. Observou-se que apenas o FP tinha atividade fungistática, nos demais tratamentos o efeito era fungicida. Isso provavelmente foi resultado da alta volatilidade do OEC que

matou as células fúngicas da parte superior do disco de micélio que não entra em contato com o meio de cultura.

Outros trabalhos relatam o efeito antimicrobiano de óleos essenciais no desenvolvimento *in vitro* de alguns patógenos. Anaruma et al. (2010) determinaram a atividade de 28 óleos essenciais de plantas medicinais contra *Colletotrichum gloeosporioides*, constatando melhor atividade antifúngica de quatro espécies: *C. flexuosus*, *C. citratus*, *Coriandrum sativum* e *Lippia alba*, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,25 e 0,30 mg L<sup>-1</sup>. Harris (2002) relatou que o efeito antifúngico do OEC parece estar associado predominantemente à membrana da célula fúngica, ocorrendo perturbações a essa estrutura como perdas de conteúdo, bloqueio à síntese de membrana, respiração e consequente morte celular.

Valencia et al. (2011) observaram através do método de diluição em ágar, efeito antifúngico do OE de *C. citratus* sobre *C. gloeosporioides* na dose de 50 µL L<sup>-1</sup>, havendo um crescimento micelial de 5 e 61,67 mm em incubação com OE de *C. citratus* e Benomyl, respectivamente. Os autores consideraram a atividade volátil do óleo como principal fator da diferença significativa.

Adukwu, Allen e Phillips (2012) observaram que o OEC mesmo em baixas concentrações (0,03 e 0,06% v/v) foi eficaz na inibição do crescimento de cinco isolados de *Staphylococcus aureus* e que a 0,125% (v/v) o efeito foi bactericida. Os autores também compararam o efeito isolado dos principais componentes do OEC e o citral se destacou como o principal componente deste óleo apresentando uma zona de inibição de 8,6 cm (ou seja, não houve crescimento na placa) sugerindo que o citral pode ser responsável pela maior parte da atividade antibacteriana deste óleo. Pela observação do resultado da cromatografia do OEC (Tabela 1) observa-se que o citral se destacou como componente majoritário, desta forma, a atividade antifúngica contra *C.*



*lindemuthianum* pode estar relacionada ao citral. Há vários relatos do uso do citral no controle *in vitro* de outras espécies de *Colletotrichum*.

Alzate et al. (2009) demonstram que o citral a 300 mg L<sup>-1</sup> inibiu completamente o crescimento micelial e esporulação de *C. acutatum* superando o fungicida Mancozeb. A porcentagem da inibição da germinação de esporos foi de 100% com o citral a 250 mg L<sup>-1</sup>. Esse componente majoritário superou o próprio óleo essencial da espécie que este foi extraído (*C. citratus*), uma vez que o OE puro inibiu em 63,63 e 78,9% o crescimento micelial e a esporulação na concentração de 400 mg.L<sup>-1</sup>, sugerindo a potencialidade prática das aplicações dos OEs e seus componentes majoritários no controle racional da antracnose do tomateiro.

Shukla et al. (2009) demonstraram a atividade fungitóxica do citral sobre diversos fitopatógenos, entre estes *Alternata alternata* que teve inibição de 100% do seu crescimento micelial pelo geranial e de 79,4% pelo neral e *Fusarium oxysporum* que teve seu crescimento micelial inibido em 96,6% e 82,8% pelo geranial e neral, respectivamente. Estes monoterpenos oxigenados, segundo Bakkali et al. (2008), como são hidrofóbicos provavelmente irão preferir deslocar-se da fase aquosa em direção às estruturas da membrana. O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade, promovendo a dissipação da força próton motiva, redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana levam ao comprometimento das suas funções.

Segundo Rasooli et al. (2006), essas substâncias quando em contato direto com os micro-organismos, causam a permeabilidade das membranas celulares, causando extravasamento dos seus conteúdos. Além disso, álcoois terpênicos foram identificados na composição do OEC como geraniol e o linalol

(Tabela 1). Pesquisas de Dorman e Deans (2000) apontam que álcoois agem como desidratantes e solventes provocando a desnaturação das proteínas.

O OEV apresentou atividade antifúngica inferior ao OEC, entretanto, causou inibições de crescimento micelial e germinação de conídios de *C. lindemuthianum* acima de 50% (Gráfico 1 B e D e Figura 4). Esses resultados demonstram que os micro-organismos diferem em sua resistência a determinados óleos essenciais, ou seja, os micro-organismos apresentam uma reação específica a determinado OE.

Outros trabalhos já demonstraram atividade antimicrobiana do OEV. Maia et al. (2010) avaliaram os OEs de *V. brasiliiana* e *V. remotiflora* quanto as suas propriedades antimicrobianas, frente a uma gama de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e os autores observaram atividade antibacteriana de largo espectro, inibindo o crescimento de todas as espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas testadas, com destaque para *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Bacillus subtilis*. A atividade antimicrobiana deste OE na dose de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  provavelmente está relacionada à alta quantidade de sesquiterpenos como os que foram encontrados neste trabalho: Germacreno-D, biciclogermacreno,  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno (Tabela 2). Montanari et al. (2011) atribuem esses efeitos aos sesquiterpenos devido à capacidade de inibição da respiração, ao aumento da permeabilidade da membrana celular e à ruptura da integridade da membrana que resulta em um vazamento dos íons de  $\text{K}^+$  e, conseqüente, perda quimiosmótica da célula. Óleos ricos na mistura biciclogermacreno/germacreno-D, demonstraram potente atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Rhodococcus equi* (COSTA et al., 2009). Os OEs de *Lantana camara* e *Aloysia virgata*, ricos em germacreno-D, apresentaram atividade antibacteriana moderada contra bactérias Gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*) e apenas o OE de *A. virgata* foi ativo contra bactérias Gram-negativas (MONTANARI et al., 2011).

Além da atividade antifúngica demonstrada pelos OEs, foram observadas alterações na coloração das colônias fúngicas, pois essas se apresentaram escuras em meio BDA, e assumiram coloração branca (Figura 4) com o aumento das concentrações dos OEs incorporados ao meio de cultura. Comportamento semelhante foi relatado por Venturoso et al. (2011), trabalhando com *Fusarium solani*, os autores observaram coloração micelial rosada em meio BDA e esbranquiçada com aumento das concentrações de extratos incorporados ao meio. Franzener et al. (2003) verificaram alterações morfológicas nas colônias de *B. sorokiniana*, sobretudo na cor, pois se apresentaram escuras, quase negras, em BDA, e assumiram coloração esbranquiçada com o aumento das concentrações do extrato aquoso de cânfora.

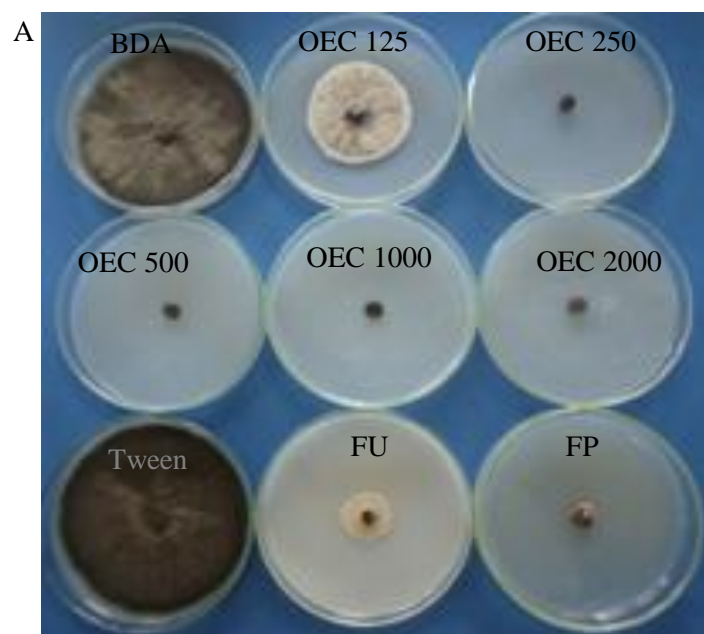
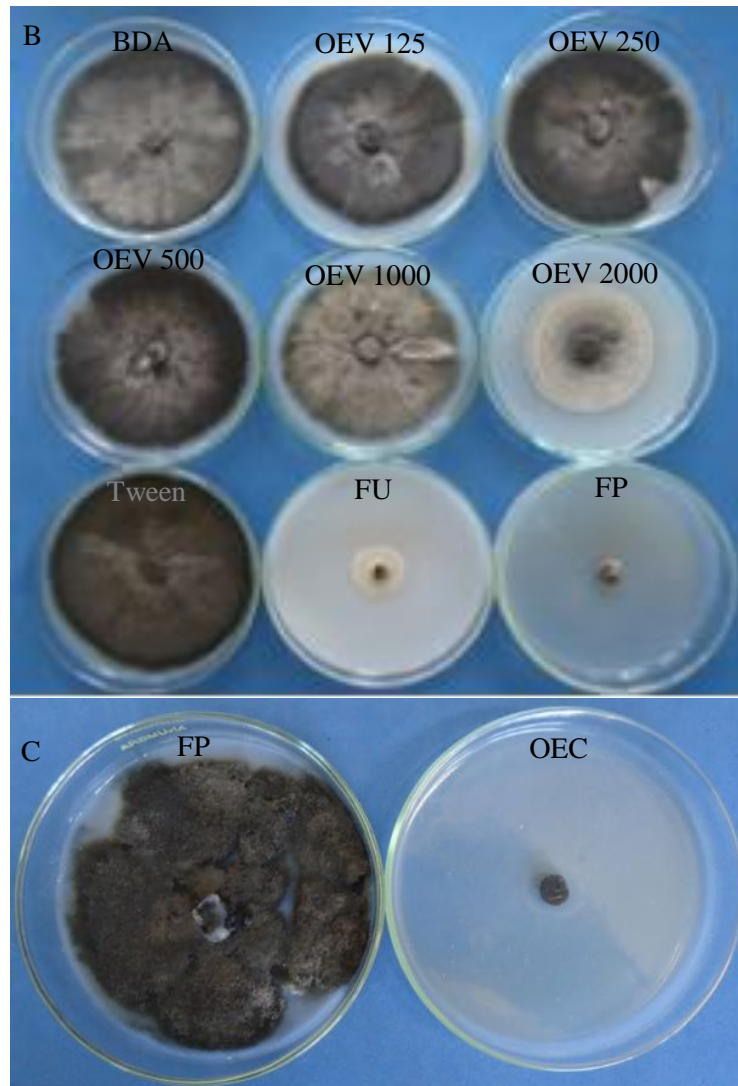


Figura 4 Efeito de diferentes concentrações (125, 250, 500, 100 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) (A), *Vernonia polyanthes* (OEV) (B), fosfito de potássio (FP), fungicida (FU), tween 20 e água destilada sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* (...continua...)



Nota: Efeito fungistático do FP (C) e fungicida do OEC.

### 4.3 OEs e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação

Em casa de vegetação, tanto o OEC quanto o OEV reduziram a área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA) (Gráfico 2). Entretanto o OEC proporcionou maior redução. A AACPA, referente aos tratamentos constituídos de OEC, apresentou comportamento quadrático e reduziu a severidade da doença com o aumento das concentrações, com maior redução (57,23% em relação à testemunha) na concentração de  $1.450 \mu\text{L L}^{-1}$ , a partir da qual constatou-se o aumento da severidade da doença (Gráfico 2A).

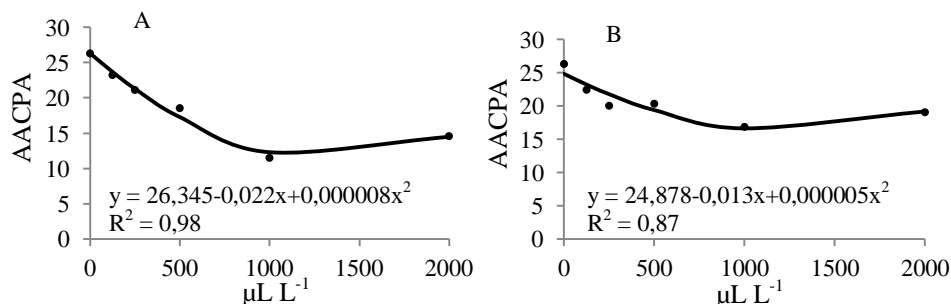


Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPA) 35 dias após a inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijoeiro cultivar Pérola, tratadas com diferentes concentrações (0, 125, 250, 500, 100 e 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (A) e *Vernonia polyanthes* (B)

Nota: Dados transformados para  $\sqrt{x} + 0,5$ .

De maneira semelhante, a AACPA dos tratamentos constituídos de OEV apresentou comportamento quadrático, e os tratamentos reduziram a severidade da doença em 37,62%, em relação à testemunha, na concentração de  $1.320 \mu\text{L L}^{-1}$  (Gráfico 2 B). Os tratamentos com FP e fungicida (FU) reduziram a AACPA

em 60,36 e 62,14%, respectivamente, em relação à testemunha. Não houve diferença estatística entre FP e FU e o OEC a  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ . Alguns autores já confirmaram o efeito do OE de outras espécies de *Cymbopogon* spp. no controle de diversas antracnoses. Anamura et al. (2010) constataram que a aplicação do óleo essencial de *C. citratus* nas doses de 0,12 e 0,25 g L diminuiu a severidade da antracnose em frutos de maracujazeiro causada por *C. gloeosporioides*, não havendo diferença significativa em relação ao fungicida Procloraz.

Foi observado por Valencia et al. (2011) que a pulverização e fumigação foliar com  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  de OE de *C. citratus* controlou em 100% o desenvolvimento da antracnose de *Hibiscus rosa-sinensis* inoculada com *C. gloeosporioides* não apresentando diferença significativa ao fungicida Benomyl, entretanto, houve diferença em relação à testemunha pulverizada com água destilada, neste tratamento a doença desenvolveu-se normalmente nas plantas alcançando uma taxa de infecção de 34%.

Alguns autores atribuem o controle parcial de outras antracnoses com OEC à atividade antifúngica do citral, entretanto para esta confirmação é necessário realizar experimentos testando o efeito isolado do neral e geranial. Garcia et al. (2008) observaram que o citral a 1% foi responsável pelo controle de 70% da antracnose do mamão e 60% da antracnose da banana. Segundo Bakkali et al. (2008), os OEs, ricos em terpenos, causam danos em lipídios e proteínas, quebram as paredes e membranas celulares e sendo assim, todo esse processo resulta em lise celular, já nas células eucarióticas, os OEs desestabilizam a membrana mitocondrial e danificam as proteínas de membrana plasmática.

#### 4.4 Estudos da germinação e do desenvolvimento micelial *in vivo* de *C. lindemuthianum*

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que em todos os tratamentos, com as coletas realizadas quatro horas após a inoculação não houve germinação de conídios de *C. lindemuthianum* (Figura 5). Nas amostras coletadas oito horas após a inoculação não houve germinação, exceto no tratamento com água destilada no qual foram observados conídios iniciando o processo germinativo (Figura 6).

Nas observações feitas em folhas de feijoeiro tratadas com água destilada e coletadas dezesseis horas após a inoculação, foi possível notar os conídios em estágio avançado de germinação, apresentando nítido desenvolvimento micelial na superfície das folhas. Entretanto nas observações realizadas nas folhas tratadas com OEV e OEC, nesse mesmo tempo de coleta, notou-se que os conídios apresentavam pequena germinação e no tratamento com FP os conídios não germinaram (Figura 7).

Diferenças expressivas foram visualizadas quarenta e oito horas após a inoculação, sendo que, nas folhas tratadas com água destilada houve nítido desenvolvimento micelial e emissão de muitos tubos germinativos próximo às nervuras da superfície abaxial (Figura 8 A). O mesmo não aconteceu nas folhas pulverizadas com o OEC e OEV (Figura 8 B e C), em que os conídios apresentaram baixa germinação e micélio pouco desenvolvido. No tratamento com FP não ocorreu germinação de conídios (Figura 8 D).

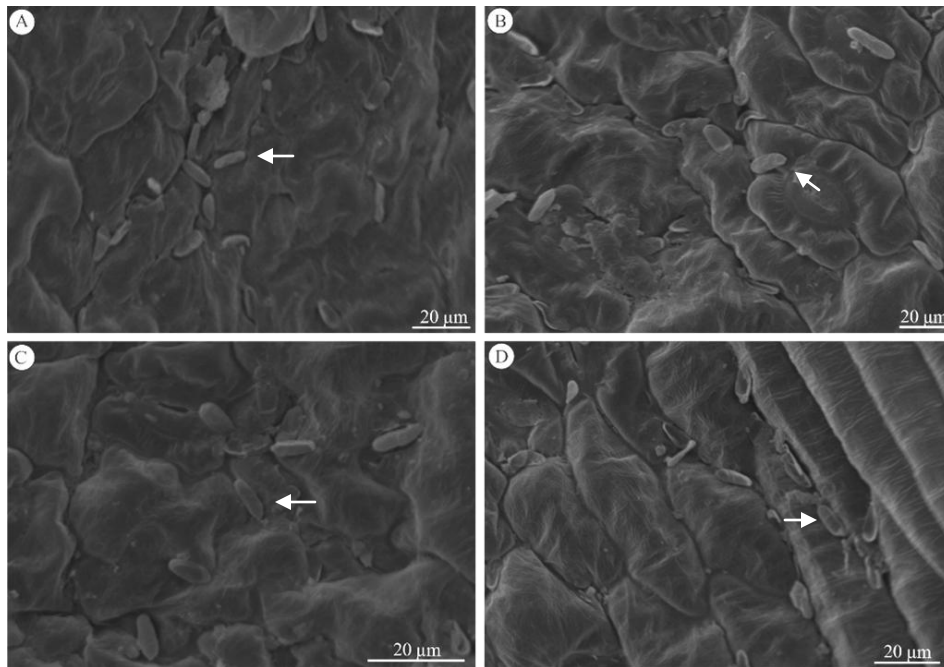


Figura 5 Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, às 4 horas após a inoculação

Nota: Folhas pulverizadas com água destilada (A), óleo essencial de *Vernonia polyanthes* 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (B), *Cymbopogon flexuosus* (C) 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e fosfito de potássio 5  $\text{mL L}^{-1}$  (D).



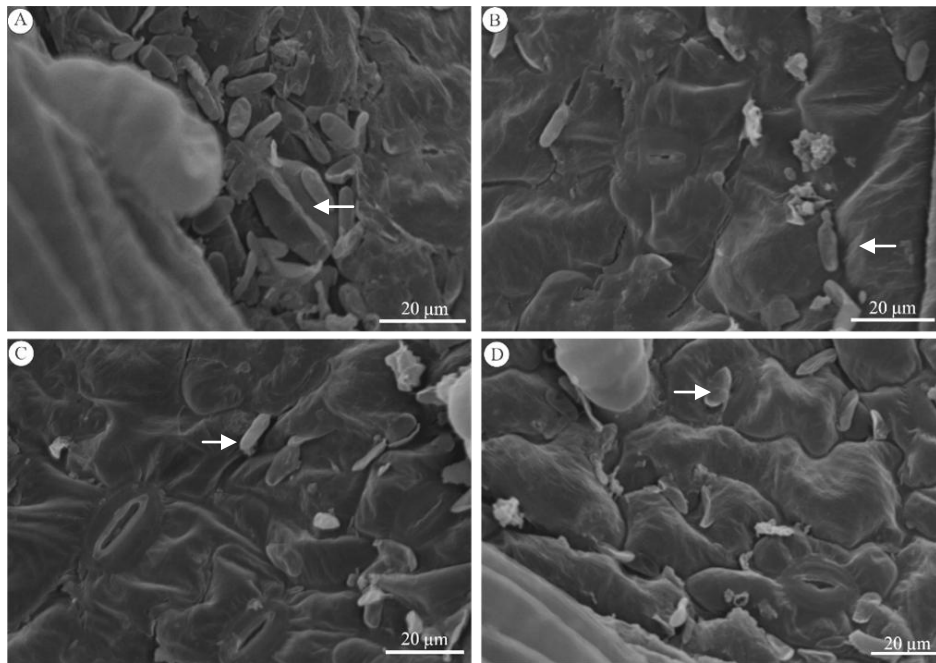


Figura 6 Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, às 8 horas após a inoculação

Nota: Folhas pulverizadas com água destilada (A), óleo essencial de *Vernonia polyanthes* 1000 uL.L<sup>-1</sup> (B), *Cymbopogon flexuosus* (C) 1000 uL.L<sup>-1</sup> e fosfito de potássio 5mL.L<sup>-1</sup> (D).

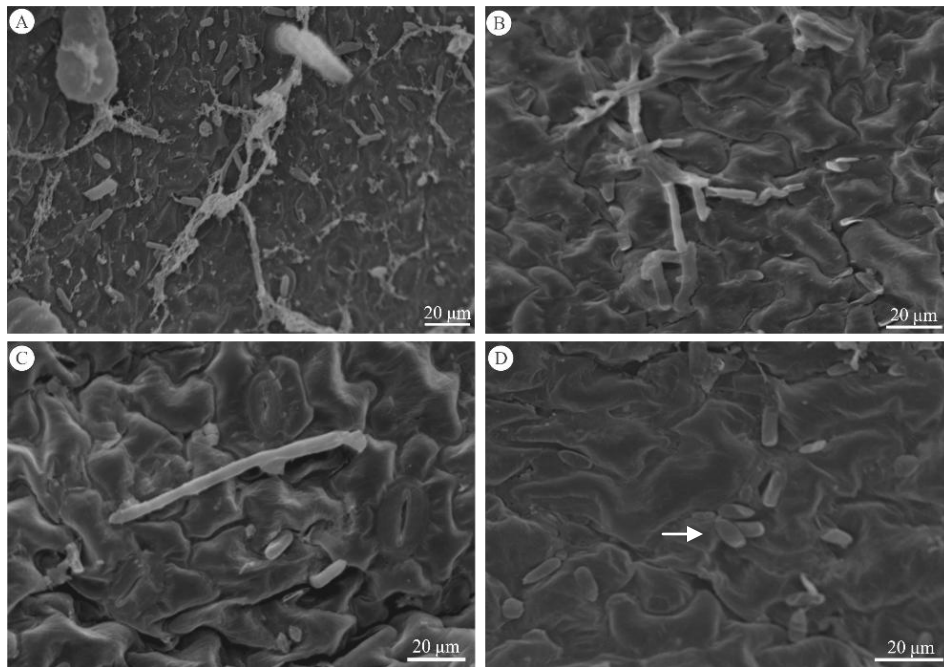


Figura 7 Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, às 16 horas após a inoculação

Nota: Folhas pulverizadas com água destilada (A), óleo essencial de *Vernonia polyanthes* 1000 uL L<sup>-1</sup> (B), *Cymbopogon flexuosus* (C) 1000 uL L<sup>-1</sup> e fosfito de potássio 5mL L<sup>-1</sup> (D).

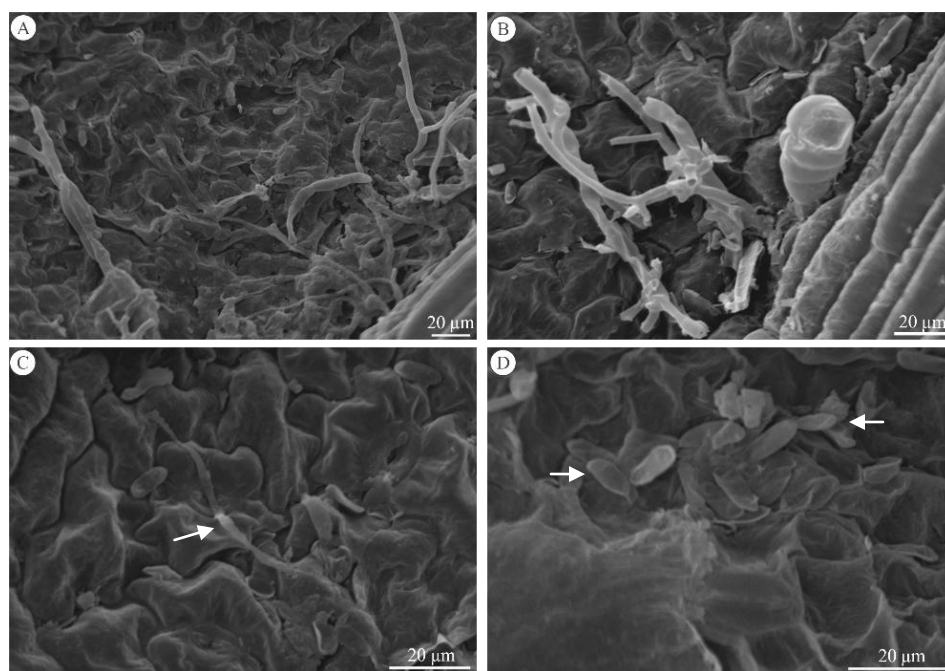


Figura 8 Eletromicrografia de varredura de folhas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, às 48 horas após a inoculação

Nota: Folhas pulverizadas com água destilada (A), óleo essencial de *Vernonia polyanthes* 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (B), *Cymbopogon flexuosus* 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e fosfito de potássio 5  $\text{mL L}^{-1}$  (D).

Esta efetividade direta dos fosfitos contra fungos está relacionada principalmente ao íon fosfito que parece ter ação direta sobre o patógeno (PEREIRA et al., 2012). Esse efeito direto pode ocorrer pelo: rompimento das paredes e membranas celulares dos patógenos, provavelmente devido a mudanças transcricionais de vários genes putativos que codificam proteínas envolvidas na biossíntese dos componentes da parede celular; síntese de aminoácidos; metabolismo de proteínas; metabolismo energético; desintoxicação e estresse oxidativo, comprometendo a morfologia e a fisiologia dos patógenos (KING et al., 2010). Além disso, os fosfitos também podem reduzir a

esporulação dos micro-organismos, possibilitando com isso a redução do potencial de inóculo dos patógenos (SILVA et al., 2013).

É importante ressaltar que os resultados obtidos nesse trabalho com o uso da MEV corroboram os resultados observados no teste *in vitro* de germinação de conídios, em que houve inibição da germinação de conídios com o OEC, FT e OEV. Outros autores já utilizaram a MEV para demonstrar a atividade antifúngica dos OEs. Pereira et al. (2011) trataram folhas de café com OE de *Cinnamomum zeylanicum* e *C. citratus* na concentração de  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ , e as inocularam com *Cercospora coffeicola* dois dias depois. Por meio das observações com MEV, os autores verificaram uma redução na germinação e no tamanho do micélio ocorrendo plasmólise de alguns conídios.

Hoyos et al. (2012) observaram através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) os sítios de atuação dos OEs de *C. citratus* e *C. martini* sobre *Pseudocercospora griseola*. Os autores visualizaram graves danos na ultraestrutura celular dos conídios, como alterações no conteúdo citoplasmático, vacuolização, ruptura da membrana plasmática, da parede celular, penetração do óleo, condensação citoplasmática e diminuição das cristas mitocondriais.

#### **4.5 Análises bioquímicas da indução de resistência**

A interação tripla (Tratamentos x Épocas de coleta x Inoculação) foi significativa para a atividade das enzimas POX e FAL (Tabela 4). Em plantas inoculadas, a atividade da POX foi significativamente maior no tratamento com FP aos 8 e 13 d.a.p. (dias após a pulverização) diferindo da testemunha, entretanto aos 10 dias não houve diferença significativa entre esses tratamentos. Com relação ao OEC, houve maior atividade da POX aos 8 d.a.p. em relação ao controle. O aumento da POX aos 8 d.a.p. nos tratamentos com FP e OEC contribuiu para o controle do patógeno, uma vez que a inoculação foi realizada

aos 7 d.a.p, ou seja, rapidamente a planta reconheceu o fungo e aumentou o nível de POX.

Em plantas não inoculadas apenas o FP aos 8 d.a.p. se diferenciou dos demais tratamentos (Tabela 5). Em relação ao período de coleta houve diferença estatística em plantas inoculadas, sendo que o FP aos 13 d.a.p. apresentou maior teor de POX quando comparado aos 8 e 10 d.a.p. Plantas pulverizadas com OEC apresentaram maior atividade aos 10 e 13 d.a.p. Houve diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, sendo que plantas que foram desafiadas com o fungo *C. lindemuthianum* apresentaram maiores teores de POX.

Tabela 4 Desdobramento dos graus de liberdade para a interação tripla dos tratamentos aplicados x épocas de coleta x plantas com e sem inoculação

Fontes de variação	Graus de liberdade	POX	FAL
		Quadrado médio	
Tratamentos (T)	2	13638,36	2,47
Épocas (E)	2	26679,75	4,18
Inoculação (I)	1	196848,42	3,81
T x E	4	14,74,45 <sup>NS</sup>	0,7
T x I	2	5956,05	1,11
E x I	2	31200,47	0,49
T x E x I	4	3042,39	0,27
Blocos	2	810,14 <sup>NS</sup>	0,003 <sup>NS</sup>
Erro	34	886,98	0,04
Total	53	-	-
C.V. (%)	-	14,34	24,46

<sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

Tabela 5 Atividade da peroxidase  $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína em plantas de feijoeiro com e sem inoculação de *C. lindemuthianum*, no estágio V3/V4, coletadas aos 8, 10 e 13 dias após a pulverização com fosfito de potássio (FP), óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) e água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Tratamentos	Sem Inoculação			Com Inoculação		
	8 <sup>NS</sup>	10	13	8	10	13
FP	189,24a	147,56a	163,76a	202,47aC	326,8aB	382,03aA
OEC	118,14b	134,43a	150,87a	192,92aB	334,36aA	315,21bA
H <sub>2</sub> O	150,29b	140,93a	131,1a	145,06bC	203,1aB	311,43bA
C.V. (%)	14,34					

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>NS</sup>Não houve diferença estatística para o fator época de coleta x tratamentos para as análises das plantas sem inoculação ( $p=0,1815$ ).

Considerando a atividade da POX nos tempos 1, 3, 6, 8, 10 e 13 d.a.p. em plantas não inoculadas (Tabela 6), sugere-se que a pulverização do FP apresentou um papel ativo na potencialização e antecipação (*primming*) da atividade dessa enzima, demonstrando o papel deste produto em realizar essa defesa da planta, uma vez que, houve diferença da testemunha aos 1, 3, 6 e 8 d.a.p. Com relação ao OEC, houve diferença significativa em relação à testemunha aos 1, 3 e 8 d.a.p.

Tabela 6 Atividade da peroxidase  $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína em plantas de feijoeiro sem inoculação de *C. lindemuthianum*, no estágio V3/V4, coletadas aos 1, 3, 6, 8, 10 e 13 dias após a aplicação de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) e água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Tratamentos	Dias após pulverização					
	1	3	6	8	10	13
FP	145,31aB	203,6aA	213,17aA	189,24aA	147,66aB	163,76aB
OEC	151,41aB	193,87aA	185,06bA	118,14cB	134,43aB	150,87aB
$\text{H}_2\text{O}$	107,04bB	159,36bA	158,7bA	150,29bA	141,03aA	131,1aB
C.V. (%)	11,77					

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A indução de resistência com OEs pode estar relacionada a sua constituição química, sabe-se que os OEs possuem diversas substâncias orgânicas com capacidade de indução, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre (DEWICK, 1997). Assim pelos dados de cromatografia da Tabela 1 foi confirmada a presença de algumas dessas substâncias que provavelmente contribuíram para o aumento dos teores de POX nos tecidos do feijoeiro. Pereira et al. (2012) constataram aumento da enzima POX em plantas de café pulverizadas com OE de citronela que resultou em diminuição da cercosporiose.

Com relação aos fosfitos, recentemente Eshraghi et al. (2011) relataram que os fito-hormônios ácido salicílico e jasmônico/etileno estão envolvidos nos mecanismos de defesa induzidos por fosfito, sugerindo que este indutor permite o recrutamento de moléculas que participam de diferentes rotas de resposta de defesa. Segundo Daniel e Guest (2006), após o tratamento com fosfito, ocorre acúmulo de compostos fenólicos nas células, formação de agregados

citoplasmáticos e de fenóis ao redor das células infectadas e rápido aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, seguido por reações de hipersensibilidade. Ribeiro Júnior et al. (2006) obtiveram além do aumento de POX em plantas de cacau tratado com FP, o controle parcial da murcha de verticílio.

A relação positiva entre a atividade da POX e a resistência de plantas a doenças têm sido relatada em diversos trabalhos, e o aumento da atividade desta enzima durante o desenvolvimento da doença tem sido correlacionado à expressão de resistência em diferentes patossistemas. Desta forma, o aumento da atividade da POX poderia explicar a menor severidade da antracnose do feijoeiro observada em plantas tratadas com o FP e o OEC nos experimentos de severidade. Martins et al. (2013) trabalhando também com a cultivar Pérola, observaram aumento da atividade da POX em plantas tratadas com rizobactérias e inoculadas com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), os autores também observaram diminuição da severidade da doença em níveis de 42 a 76%.

Campos et al. (2004) observaram que a atividade da POX foi significativamente maior em plantas de feijoeiro tratadas com ácido salicílico antes e após a inoculação de *C. lindemuthiaum*, havendo correlação positiva entre o aumento da atividade da POX e a resistência à antracnose. Esta resistência está relacionada à capacidade da POX em produzir radicais livres, tóxicos para o patógeno em explosões oxidativas, participar da síntese de lignina para reforçar a parede celular, bem como produzir moléculas sinalizadoras como o  $H_2O_2$  que podem levar à expressão de genes relacionados a outros mecanismos de resistência (KAO, 2003).

Com relação à atividade da enzima FAL, houve diferença significativa para a interação tripla (Tratamentos x Épocas de coleta x Inoculação). Nas plantas inoculadas e pulverizadas com FP houve maior atividade da FAL quando



comparada às plantas pulverizadas com OEC e água aos 8 e 10 d.a.p. (Tabela 7) Já aos 13 d.a.p., plantas pulverizadas com FP produziram menos FAL e não se diferenciaram do óleo. Possivelmente isto se deu pelo aumento da FAL nos períodos iniciais pós inoculação (8 e 10 d.a.p.) causando um custo metabólico à planta no último dia de avaliação. Este mesmo efeito ocorreu nas plantas tratadas com água, ou seja, a atividade da FAL diminuiu consideravelmente no último dia após a inoculação (13 d.a.p.), entretanto, a atividade desta enzima foi inferior aos eliciadores FP e OEC, isto resultou em maior severidade da antracnose nas plantas tratadas com água.

Assim como o FP, plantas pulverizadas com OEC e inoculadas apresentaram maior atividade da FAL em todos os períodos de avaliação. Esse aumento pode significar que toda a rota dos fenilpropanoides sofreu alteração, ou seja, mecanismos como síntese de lignina, compostos fenólicos, quinonas, etc. podem ter sido potencializados em função dos produtos testados.

Nas plantas não inoculadas, não houve diferença estatística entre os produtos aos 8 e 13 d.a.p., apenas aos 10 d.a.p. plantas pulverizadas com FP apresentaram maior atividade da FAL. Desta forma, fica evidente que o pico da FAL ocorre aos 10 d.a.p.

Tabela 7 Atividade da fenilalanina amônia-liase  $\text{mMol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$  em plantas de feijoeiro com e sem inoculação de *C. lindemuthianum*, no estádio V3/V4, coletadas aos 8, 10 e 13 dias após a aplicação de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) e água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Tratamentos	Sem Inoculação			Com Inoculação		
	8	10	13	8	10	13
FP	0,33aB	1,74aA	0,22aB	1,83aB	2,45aA	0,58aC
OEC	0,25aA	0,59bA	0,55aA	0,94bB	1,98bA	0,80aB
$\text{H}_2\text{O}$	0,31aB	0,79bA	0,32aB	0,45cA	0,68cA	0,17bC
C.V. (%)	24,46					

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Considerando agora, a atividade da FAL aos 1, 3, 6, 8, 10 e 13, d.a.p. nas plantas de feijão não inoculadas, o FP foi superior aos demais tratamentos aos 1, 6 e 10 d.a.p. (Tabela 8). Já para plantas pulverizadas com OEC, houve maior atividade da FAL aos 3 e 13 d.a.p. Não houve diferença significativa entre os tratamentos aos 8 d.a.p. Com relação à época de coleta, plantas pulverizadas com FP e o OEC apresentaram maior atividade da FAL aos 3 d.a.p. Já para o tratamento testemunha, houve maior produção de FAL aos 1, 3, 6 e 10 d.a.p.

Tabela 8 Atividade da fenilalanina amônia-liase em  $\text{mMol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$  em plantas de feijoeiro sem inoculação de *C. lindemuthianum*, no estágio V3/V4, coletadas aos 1, 3, 6, 8, 10 e 13 dias após a pulverização de fosfito de potássio (FP), óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (OEC) e água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Tratamentos	Dias após pulverização					
	1	3	6	8	10	13
FP	1,31aC	2,15bA	1,69aB	0,33aD	1,74aB	0,22bD
OEC	0,73bC	2,53aA	1,44bB	0,25aD	0,59bC	0,55aC
$\text{H}_2\text{O}$	0,71bA	0,98cA	0,78cA	0,31aB	0,79bA	0,32bB
C.V. (%)	13,6					

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A maior atividade da FAL nas plantas pulverizadas com FP e OEs já foi observada por outros autores. Saindrenan et al. (1988) observaram que aplicação de fosfitos em *Vigna unguiculata*, previamente infectadas com *Phytophthora cryptogea*, aumentou significativamente a atividade da FAL. Sellamuthu et al. (2013) observaram aumento da FAL em frutos de abacate com a aplicação do OE de tomilho. Este aumento tem sido frequentemente referido como uma reação de defesa das plantas, mostrando um aumento significativo após a infecção por patógenos (EL MODAFAR et al., 2012).

Martins et al. (2013) constataram aumento nos teores de FAL no segundo estágio fenológico de plantas de feijoeiro cultivar Pérola, tratadas com rizobactérias promotoras de crescimento. Os autores também observaram diminuição da severidade da murcha do feijoeiro (*Cff*) em até 76%, além do aumento do peso seco da parte aérea e raiz das plantas tratadas. Campos et al. (2003) observaram que plantas de feijoeiro da cultivar Pérola tratadas com ácido salicílico tiveram atividade de PAL mais elevada do que plantas tratadas com água, sendo que plantas desafiadas com o patógeno *C. lindemuthianum* apresentaram maior atividade de PAL do que plantas não inoculadas.

A FAL catalisa a reação de desaminação de *L*-fenilalanina a ácido *trans*cinâmico, a qual é a primeira etapa envolvida na rota dos fenilpropanoides que é de grande importância para a produção de compostos de defesa da planta contra patógenos (TSUGE et al., 2004).

Desta forma, o OEC e o FP podem constituir nova alternativa de manejo para o controle da antracnose do feijoeiro, pois além da indução de importantes enzimas de defesa como a POX e a FAL, também foi confirmada a presença de substâncias antifúngicas nesses produtos. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados, como a demonstração da eficiência desses produtos no controle da antracnose em condições de campo, as doses a serem utilizadas e a determinação da toxicologia ao ambiente e ao homem, bem como a adequação da produção dos OEs e sua formulação.

## 5 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e o fosfito de potássio reduzem o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, já o óleo essencial de *Vernonia polyanthes* inibiu em menor grau o crescimento micelial e a germinação de *C. lindemuthianum*.

Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *V. polyanthes* assim como o fosfito de potássio reduzem a germinação dos conídios e o desenvolvimento micelial de *C. lindemuthianum* na superfície de folhas do feijoeiro.

Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *V. polyanthes* promovem controle parcial da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação, sendo que o fosfito de potássio foi mais promissor no controle da doença.

Os componentes majoritários do OEC foram o geranial e neral, já no OEV foram encontrados maiores teores de germacreno-D, biciclogermacreno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno.

O fosfito de potássio e o óleo essencial de *C. flexuosus* induziram aumento na atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase nos tecidos do feijoeiro, sendo o fosfito mais efetivo na indução.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2007. 469 p.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. A atividade anti-biofilme de óleos essenciais de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) e toranja (*Citrus paradisi*) sobre cinco isolados de *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p. 1217-1227, 2012.
- ALVES, E. et al. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, p. 433-466.
- ALZATE, D. A. O. et al. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad Antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), timoncillo (*Mymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. **Revista de la facultad de química farmacêutica**, Medellín, v. 16, n. 1, p. 116-125, 2009.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 441-443, 1997.
- BETTI, L. et al. Use of homeopathic preparations in phytopathological models and in field trials: a critical review. **Homeopathy**, Edinburgh, v. 98, p. 244-266, 2009.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 333-349.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CAMPOS, A. D. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, n. 3, p. 1-6, 2003.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.

COSTA, E. V. et al. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 78-81, 2009.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defense responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Dordrecht, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: J. Wiley, 1997. 520 p.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1121-1128, 2008.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 308–316, 2000.

EL MODAFAR, C. et al. Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 55–63, 2012.

ESHRAHGI, L. et al. Phosphite primed defense responses and enhanced expression of defense genes in *Arabidopsis thaliana* infecteds with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, 2011.

FERREIRA, D. F. Program SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 163-168, 2008.

GODOY, C. V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 104, p. 336-345, 1997.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 12, p. 83-91, 2002.

HOYOS, J. M. A. et al. Atividade antifúngica e alterações ultraestruturais em *Pseudocercospora griseola* tratado com óleos essenciais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 270-284, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 2013. 90 p.



IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BHT) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Amsterdam, v. 39, p. 83-89, 2003.

KAR, M. E.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 57, p. 315-319, 1976.

KING, M. et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Springer, v. 284, p. 425-435, 2010.

KUHN, O. J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 58, p. 199-208, 2001.

LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops, Norcross**, California, v. 90, n. 4, p. 11-13, 2006.

MAIA, A. I. V. et al. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 584-586, 2010.

MARCO, C. A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429-32, 2007.

MARINGONI, A. C.; BARROS, E. M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, p. 197-200, 2002.

- MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta indica**: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: [s. n.], 2002. 142 p.
- MARTINS, S. J. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 66, p. 1, 2013.
- MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, p. 1550-1555, 2011.
- MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa, 2009. p. 139-152.
- PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata*, on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 116, n. 6, p. 263-270, 2009.
- PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 171-178, 2008.
- PEREIRA, R. B. et al. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 383-390, 2012.
- PEREIRA, R. B. et al. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 115-123, 2011.
- PERINA, F. **Controle de Erysiphe diffusa com óleos essenciais e leite**: Estudos ultraestrutural e do modo de ação. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- POMPEU, S. S.; DUDIENAS, C.; ITO, M. F. Linhagens de feijoeiro resistentes ao fungo da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), obtidas pelo uso dos genes Mex2 e Mex3. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 18, n. 3/4, p. 220-226, 1992.

RASOOLI, I. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Reading, v. 17, p. 359-364, 2006.

RAVA, C. A. et al. Obtenção de germoplasma de feijão livre de patógenos transmissíveis pela semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 3, p. 135-146, 1981.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticilium dahliae* em mudas de cacaueteiro. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, p. 629-636, 2006.

RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.

SAINDRENAN, P. et al. Modification of the phosphite induced resistance response in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea* by  $\alpha$ -aminooxyacetate. **Plant Science**, Oxford, v. 58, p. 245-252, 1988.

SALVADOR, C. A. **Análise da conjuntura agropecuária 2009/2010, feijão**. Curitiba: 2009. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao\\_2009\\_10.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2009_10.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2010.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J. BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 41-65.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, p. 129-37, 2000.

SELLAMUTHU, P. S. et al. Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 81, p. 66-72, 2013.

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHUKLA, R. et al. Efficacy of Lippia alba (Mill) N. E. Brown essential oil and its monoterpenes aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 135, p. 165-170, 2009.

SILVA, A. C. et al. Coffee-leaf extract and phosphites on the curative control of powdery mildew in eucalyptus mini-stumps. **Forest Pathology**, Oregon, v. 43, p. 118-126, 2013.

SILVA, A. C. et al. Óleos essenciais para o tratamento preventivo da ferrugem asiática da soja. **European Journal Plant Pathology**, Amsterdam, v. 134, p. 865-871, 2012a.

SILVA, N. C. et al. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de extratos aquosos e óleos essenciais de plantas medicinais. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2012b.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In. SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 387-415.

SINGH, S. Atividade antifúngica in vitro de alguns óleos essenciais sobre fungos que degradam alimentos. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, Udaipur, v. 4, n. 2, p. 107-111, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TSUGE, S. et al. Involvement of phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 478-484, 2004.

VALENCIA, L. D. Lemongrass [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.] Oil: potential biocontrol agent against major fungal pathogens of Gumamela (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). **Philippine Journal of Crop Science**, Philippines, v. 36, n. 3, p. 70-75, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Oxford, v. 11, p. 463-467, 1963.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rizhosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VENTUROSIO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, p. 779-784, 1965.