



JULIÁN MAURICIO ÁGREDO HOYOS

**ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
Pseudocercospora griseola E *Colletotrichum
lindemuthianum* TRATADOS COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E CONTROLE ALTERNATIVO DA
ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

LAVRAS-MG

2012

JULIÁN MAURICIO ÁGREDO HOYOS

**ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
EM *Pseudocercospora griseola* E *Colletotrichum lindemuthianum*
TRATADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE
ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

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

Orientador

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS-MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Agredo Hoyos, Julián Mauricio.

Alterações ultraestruturais e atividade antifúngica em
Pseudocercospora griseola e *Colletotrichum lindemuthianum*
tratados com óleos essenciais e controle alternativo da antracnose do
feijoeiro / Julián Mauricio Agredo Hoyos. – Lavras : UFLA, 2012.
125 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Enzimas de defesa. 3. Mancha angular.
4. Controle alternativo. 5. Doenças fúngicas. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 635.65294

**ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
EM *Pseudocercospora griseola* E *Colletotrichum lindemuthianum*
TRATADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE
ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

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

APROVADA em 13 de julho de 2012.

Dr. Flávio H. V. de Medeiros	UFLA
Dr. Messias J. Bastos de Andrade	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun	EPAMIG

Dr. Eduardo Alves
Orientador

**LAVRAS-MG
2012**

Dedico:

A minha família, especialmente.

A minha mãe, espelho da alegria e determinação

E a Kamilla, minha esposa, deva do amor e da doçura

Ofereço:

Aos estudantes

e a todos os que buscam fazer a Vida

mais digna, bela, verdadeira, ..., para todos!

AGRADECIMENTOS

À CAPES, à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pela orientação e paciência na realização do presente trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos, muito importantes na minha formação profissional.

À professora Elaine Aparecida de Souza, pelas oportunas sugestões.

À Dra. Sara Maria Chalfoun e aos professores Dr. Messias de Andrade, Dr. Paulo Estevão de Souza e Dr. Flávio Medeiros, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas recomendações para a tese.

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), pelas sugestões e colaboração: Silvino, Fábio, Fabiano, Rafael, Gilvaine, Glauco e Olivia.

À Dra. Luciane Rozwalka pelas sugestões e colaboração nas análises cromatográficas.

À Dra. Claudia Labory, pelo suporte técnico em microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Pedro Junior, pela ajuda nas análises bioquímicas das enzimas de defesa e sugestões.

Aos servidores técnicos e administrativos do Departamento de Fitopatologia, especialmente a Rute e Bruno, pela boa vontade e gentileza.

Aos amigos Belisário, Aureliano, Teresita, José, Douglas, Valery, Gigi, Edith, Beatriz, Kellem, Vânia, Jasby e Rachel, pelo apoio e companheirismo.

A todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

Que é um estudante?

É aquele que começa a indagar-se, a fazer as perguntas certas...

... E, procura as respostas.

E o estudante avança nessa busca magnífica...

Por que ainda o infinito nos inquieta?

Porque ficamos satisfeitos, petrificados em aquilo que conseguimos.

O estudante começa a desabrochar.

RESUMO

Duas das mais importantes doenças do feijoeiro são a antracnose e a mancha angular, causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pseudocercospora griseola*, respectivamente. O controle destes patógenos é difícil. O controle químico e o genético são os mais utilizados, mesmo não sendo de grande eficácia. Não entanto, pesticidas à base de óleos essenciais de plantas ou de seus constituintes têm demonstrado eficácia contra doenças em pré e pós-colheita. Este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a germinação, o crescimento micelial de duas raças de *P. griseola* e de *C. lindemuthianum*, determinar as alterações ultraestruturais dos conídios expostos aos óleos, verificar o controle da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação e avaliar o efeito do óleo de *C. citratus* na atividade de enzimas de defesa do feijoeiro. Dos 26 óleos essenciais analisados, *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* mostraram a maior atividade antifúngica para todas as raças dos dois fitopatógenos. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que estes três óleos tiveram ação citotóxica direta sobre os conídios de *P. griseola* e de *C. lindemuthianum*, causando graves danos na ultraestrutura celular, tais como vacuolização, vazamento do citoplasma, invaginação e ondulação do plasmalema. Tanto no experimento preventivo como no curativo, os óleos essenciais de *C. citratus* e *E. caryophyllata* reduziram a severidade da antracnose do feijoeiro e registrou-se aumento na atividade de enzimas de defesa pelo tratamento com óleo essencial, depois da inoculação.

Palavras-chave: Mancha angular. *Phaseolus vulgaris*. Enzimas de defesa. Controle alternativo. Doenças de plantas.

ABSTRACT

Two of the most important bean diseases are anthracnose and angular leaf spot, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Pseudocercospora griseola*, respectively. The control of these pathogens is difficult, mainly due to high genetic variability, both the pathogens are transmitted by seed and the ability to survive for several months in crop residues. The chemical and genetic control are the most widely used although not very effective. However, a pesticide based on essential oils of plants or their constituents have demonstrated efficacy against disease in pre- and post-harvest. According to the above, the objectives of this study were to evaluate the antifungal activity of essential oils on the germination, mycelial growth of two strains of *P. griseola* and *C. lindemuthianum* and visualize ultrastructural alterations in conidia exposed to oil, check the control of anthracnose in the greenhouse, and evaluate the effect of oil of *C. citratus* in the activity of common bean defense enzymes. Essential oils of the 26 analyzed *C. citratus*, *E. caryophyllata* and *C. martini*, showed the strongest antifungal activity for all strains of both pathogens *in vitro*. Through transmission electron microscopy, it was verified that *C. citratus*, *C. martini* and *E. caryophyllata* presented direct cytotoxic action on *P. griseola* and *C. lindemuthianum* conidia, causing ultrastructural alterations included loss of membrane integrity, cytoplasmic leakage, and plasmalemma retraction, undulation, and invagination. In both preventive and curative experiments, the essential oils of *C. citratus* and *E. caryophyllata* reducing anthracnose severity. It increased the activity of common bean defense enzymes by treatment with essential oil of *C. citratus*.

Keywords: Angular leaf spot. *Phaseolus vulgaris*. Defense enzymes. Alternative control. Plant disease.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	55
	ARTIGO 1 Antifungal activity and ultrastructural alterations in <i>Pseudocercospora griseola</i> treated with essential oils	56
	ARTIGO 2 Atividade antifúngica e alterações ultraestruturais por óleos essenciais a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e controle alternativo da antracnose do feijoeiro.....	86

1 INTRODUÇÃO

As doenças são uma das principais causas de baixa produtividade na cultura do feijoeiro no Brasil e nos demais países onde também é cultivada esta importante leguminosa (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). Muitas doenças podem produzir, de acordo com as condições ambientais, perdas totais na produção ou, dependendo do nível de contaminação, tornar inviáveis determinadas áreas para o cultivo. Duas das mais importantes doenças desta cultura são a antracnose e a mancha angular, provocadas pelos fungos hemibiotróficos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pseudocercospora griseola*, respectivamente (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

O controle destes patógenos não é simples, devido, principalmente, à variabilidade patogênica que apresentam e pela disseminação por meio de sementes contaminadas. Estudos mostraram que a taxa de utilização de sementes certificadas é muito baixa (< 20%) em zonas produtoras de feijão, no Brasil (HERBES et al., 2008; SENA et al., 2008). Patógenos veiculados por sementes sob condições favoráveis podem causar epidemias. Tanto a antracnose como a mancha angular, além de depreciarem a qualidade do grão, podem causar perdas maiores que 80% na produção (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Compostos biologicamente ativos encontrados em plantas parecem ser mais adaptáveis, aceitáveis e seguros em relação aos compostos sintéticos e apresentam grande fonte de compostos com potencial para controlar patógenos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006; TRIPATHI; DUBEY; SHUKLA, 2008). Entre estes, os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas são eficazes contra patógenos fúngicos e bacterianos; além disso, seus compostos são biodegradáveis, têm baixa

toxicidade em mamíferos e são rentáveis, o que os torna de grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado de pragas (DUBEY et al., 2010; DUKE, 1990; SOYLU; SOYLU; KURT, 2006). Por exemplo, alguns pesticidas comerciais à base de óleo essencial são o CinnamiteTM e o ValeroTM, aplicados contra fungos e ácaros, principalmente. Ambos os produtos são à base de óleo de canela, com cinamaldeído 30% como ingrediente ativo (ISMAN, 2000).

Em alguns trabalhos tem sido mostrado que os óleos essenciais não somente agem diretamente nos patógenos, mas podem ativar os mecanismos de defesa inatos na planta, o que é mais conhecido como indução de resistência (PEREIRA et al., 2008; QUINTANILLA; ROHLOFF; IVERSEN, 2002). Nesta linha da indução de resistência, em estudos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos de plantas medicinais foi demonstrado que eles têm potencial no controle de fitopatógenos, pela indução de fitoalexinas, que são compostos com características de eliciadores (STANGARLIN et al., 1999). Em outra pesquisa desenvolvida, o acibenzolar-S-metil (ASM) e o óleo essencial de tomilho elevaram a atividade da peroxidase em folhas de cafeeiro aos 2 e 9 dias após a pulverização (PEREIRA et al., 2008). Ainda que escassos sejam os trabalhos de indução de resistência utilizando estes compostos, eles apresentam grande potencial como indutores e estudos mais detalhados precisam ser desenvolvidos.

Na atualidade, ferramentas de pesquisa, como a bioquímica e a biologia molecular, contribuíram para a compreensão de muitos aspectos da organização molecular e genômica dos processos de interação com a célula hospedeira e com vetores, bem como da patogênese viral. Os estudos citopatológicos, bem dirigidos, complementam essas informações, permitindo verificar onde e como esses processos ocorrem no interior da célula infectada, em especial quando as pesquisas são conjugadas às técnicas moleculares e /ou bioquímicas (ALVES;

LEITE; KITAJIMA, 2008). Hipoteticamente, técnicas de pesquisa bioquímicas e moleculares, unidas às técnicas de microscopia eletrônica, tanto de transmissão como de varredura, podem auxiliar eficazmente na elucidação dos mecanismos ou modos de ação de compostos com características antimicrobianas como os óleos essenciais, além de colaborar na compreensão das interações patógeno-hospedeiro, fundamentais para a criação de novas metodologias de controle.

Por tudo o que foi mencionado, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver estudos que permitam esclarecer a atividade biológica de alguns óleos essenciais, visando avaliar seu potencial como método alternativo de controle de doenças em feijoeiro. Para isso, estudos ultraestruturais e dos mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de resistência foram também realizados, para ajudar na direção de criar novas, eficientes e ambientalmente corretas estratégias de manejo integrado da antracnose e da mancha angular do feijoeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*, L) é uma das principais fontes de proteína na dieta humana nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, os quais são responsáveis por 87,1% do consumo mundial e por 89,8% da produção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA – EMBRAPA, 2008; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2010).

Entre todas as leguminosas de grão do mundo para consumo humano direto, o feijoeiro representa o maior volume (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT, 2012). Ressalta-se sua importância socioeconômica nos diversos sistemas de produção, desde a agricultura de subsistência até a mais tecnificada, com irrigação. Para mais de 300 milhões de pessoas nos trópicos, um prato de feijão é o principal componente do regime alimentício diário. Além disso, milhões de pequenos agricultores da América Latina e da África dependem da produção e da venda do grão, como fonte importante de renda para o lar (CIAT, 2012). Só em Minas Gerais existem 295 mil produtores, a maioria de produtores familiares, que cultivam pequenas áreas e comercializam o excedente (BULISANI, 2008; EMBRAPA, 2008; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

O Brasil é o segundo produtor mundial, depois da Índia (FAO, 2010); contudo, mesmo com produção anual maior que três milhões de toneladas de feijão, o país importa em média 87,5 mil toneladas/ano. Análises de mercado atuais indicam que o aumento do consumo de feijão no país deve-se,

principalmente, à sua importância para a saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2008).

Entre os fatores mais importantes que contribuem para a diminuição e a irregularidade da produção do feijão no mundo estão as doenças. O feijoeiro comum é afetado por inúmeras doenças, as quais, além de diminuir a produtividade da cultura, depreciam a qualidade do produto. Duas das mais importantes doenças desta cultura são a antracnose e a mancha angular (RIBEIRO et al., 2011; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Outro problema sério no Brasil é que a taxa de utilização de sementes certificadas é muito baixa, correspondendo a 15%, na safra 2006/2007. Em outros estudos foi demonstrado que esta taxa, em Santa Catarina, é de apenas 20%, havendo prevalência do uso de sementes produzidas pelo próprio agricultor (HERBES et al., 2008) e, em Minas Gerais, somente 10% da área são cultivados com sementes certificadas (SENA et al., 2008). Isso representa um alto risco de aumento do inóculo de patógenos que podem ser veiculados por sementes, como é o caso dos agentes causais, tanto da antracnose como da mancha angular. Além disso, a maioria das variedades de feijão cultivadas no Brasil é de tipo de grão, semelhante ao da cultivar Carioca que, apesar da alta aceitabilidade no comércio, é suscetível à maioria dos patógenos importantes (RAMALHO; ABREU, 2006).

2.2 A mancha angular do feijoeiro

A mancha angular, incitada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun 2006, apresenta forma teleomórfica no gênero *Mycosphaerella* e pertence ao filo Ascomycota (INDEX FUNGORUM, c2008). A doença encontra-se distribuída em todas as regiões do mundo onde o

feijoeiro é cultivado; de acordo com o Commonwealth Mycological Institute (CMI), essa enfermidade ocorre em mais de 60 países (SARTORATO; RAVA, 1994). Uma característica importante deste fungo é a alta variabilidade fitopatogênica (OROZCO; ARAYA, 2005; SILVA et al., 2008).

Pseudocercospora griseola pode sobreviver em sementes e restos culturais e é facilmente disseminado por vento e água de chuva, respingos de água no solo e partículas de solo contaminadas. As condições ideais para o surgimento da doença são temperaturas entre 16 e 24 °C e alta umidade relativa >95% (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997). Os conídios deste fungo germinam sob ambiente favorável e, três dias após da inoculação, as hifas penetram pelos estômatos, crescendo entre as células. De 3 a 7 dias após a inoculação, as membranas das células infectadas se desintegram, o citoplasma celular se desorganiza e as células são destruídas com a proliferação do fungo. Assim, o patógeno coloniza extensivamente os tecidos, causando lesões necróticas e posterior esporulação (MONDA; SANDERS; HICK, 2001).

Os principais sintomas são lesões nas folhas, caules, ramos, pecíolos e vagens. Estas lesões são mais comuns nas folhas, formando manchas inicialmente irregulares, cinzas ou marrons e, aproximadamente nove dias após a infecção, começa a necrose do tecido. As lesões limitadas pelas nervuras assumem formato angular e, quando são muitas, coalescem, causando o amarelecimento e o desfolhamento prematuro da planta. Nas vagens, as lesões são superficiais, a princípio, de coloração castanho-avermelhada, quase circulares e com bordas escuras. Tem tamanho variável e, quando numerosas, coalescem, cobrindo toda a largura da vagem. Os sintomas nos caules, ramos e pecíolos são alongados e de coloração castanho-escura (JESUS JUNIOR et al., 2003).

No Brasil, até alguns anos atrás, não tinha nenhuma importância, ocorrendo somente no fim do ciclo da cultura. Entretanto, fatores como ampliação do período de plantio (três safras/ano), ocorrência do hospedeiro e de restos culturais durante a maior parte do ano, utilização da irrigação e de sementes contaminadas, favoreceram o desenvolvimento e a disseminação do fungo (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006), podendo causar perdas maiores que 80% (JESUS-JÚNIOR et al., 2001; STENGLEIN et al., 2003). Neste país, ele ocorre especialmente nas safras da seca e de outono-inverno (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Com isso, atualmente, esta doença tornou-se de grande importância no estado de Minas Gerais (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

2.3 Antracnose do feijoeiro

Esta doença é causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara 1889, com forma teleomórfica no gênero *Glomerella*, pertence ao filo Ascomycota (INDEX FUNGORUM, c2008). A antracnose, registrada nas principais regiões produtoras de feijão da América, África, Ásia e Europa, pode ocorrer em toda a parte aérea da planta e, ao encontrar condições favoráveis a seu desenvolvimento, pode causar perdas de até 100% na produção (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). Essa abrangência deve-se ao uso de cultivares suscetíveis em regiões onde ocorrem temperaturas amenas, variando de 13 a 26 °C, em determinadas épocas do ano, e alta umidade relativa >92%. Temperaturas superiores a 30 °C ou inferiores a 13 °C limitam tanto a infecção como o crescimento do fungo (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

Os elevados índices de severidade que pode atingir esta enfermidade, geralmente, se originam a partir de sementes contaminadas ou de restos vegetais infectados (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2002), nos quais pode sobreviver por até dois anos (EMBRAPA, 2008; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). A disseminação pode dar-se também por respingos da água da chuva, por insetos, animais e, mesmo, o homem, ao transportar sementes ou restos culturais infectados, principalmente ao operar máquinas agrícolas (RIBEIRO et al., 2011; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Os sintomas produzidos constam de lesões necróticas de coloração marrom-escura nas nervuras e na face inferior, podendo ser observada em toda a parte aérea da planta. Os danos são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença na lavoura. Além de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos (CHAVES, 1980). Esta doença afeta plantas de feijão em todos os estádios de crescimento, provocando lesões em folhas, caule, ramos, vagens e sementes (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). *C. lindemuthianum* apresenta grande variabilidade fitopatogênica (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007), já tendo sido identificadas na América Latina mais de 30 raças (MAHUKU et al., 2002).

No processo de infecção, o conídio germina e emite o tubo germinativo, aproximadamente 18 horas após o contato do hospedeiro com a ponta do tubo germinativo, que se incha e produz um apressório melanizado (O'CONNELL et al., 1996). A partir dessa estrutura, diferencia-se a hifa peg de penetração ou de infecção, que atravessa a parede celular da primeira célula da planta hospedeira. Possivelmente, enzimas hidrolíticas estão envolvidas neste processo, pois mudanças químicas acontecem nas regiões das paredes celulares próximas ao peg de penetração (O'CONNELL; BAILEY; RICHMON, 1985).

Uma estrutura globosa chamada de vesícula de infecção é diferenciada entre a parede e a membrana plasmática da célula epidermal. A partir desta vesícula, diferencia-se uma hifa que cresce entre a parede e a membrana plasmática das células epidermais e corticais, que permanecem vivas, apesar das modificações estruturais ocorridas no citoplasma. Aproximadamente 48 horas após a infecção, rupturas no tonoplasto e no plasmalema são notadas, terminando na completa desorganização do citoplasma dentro de 60 horas, restando apenas fragmentos da membrana. A degeneração que se dá entre 60 e 70 horas somente pode ser vista microscopicamente. Os sintomas macroscópicos aparecem depois de 96 a 120 horas depois de iniciada a infecção. Nesta fase, a hifa primária alcança uma extensão máxima de dez células epidermais e quatro camadas celulares do córtex (O'CONNELL; BAILEY; RICHMON, 1985).

O micélio primário ramifica-se numa hifa secundária após 120 horas, a qual, além de ter menor diâmetro, é capaz de crescer intercelularmente (via parede celular ou pela lamela média) e até invadir o lúmen das células vegetais mortas. Esta é a fase necrotrófica típica, na qual as células infectadas e as situadas a uma distância de até 250 μm , que ainda não foram invadidas, apresentam o citoplasma modificado e são mortas. O córtex do tecido vegetal está completamente colonizado pela hifa secundária após 6 a 8 dias. Os sintomas macroscópicos da antracnose são evidentes e característicos. Acérvulos rompendo a camada da epiderme do hospedeiro são evidentes em cerca de 10 dias e têm uma massa de conídios com setas estéreis e melanizadas (O'CONNELL; BAILEY; RICHMON, 1985).

No caso de a interação patógeno-hospedeiro ser incompatível, a célula da epiderme inicialmente infectada pelo peg de penetração morre, juntamente com as estruturas invasivas do fungo. A morte celular é localizada e as demais células que não foram invadidas, mas que estão ao redor daquela infectada,

permanecem viáveis. A vesícula de infecção não é observada, porém, em 10% das células mortas, estruturas similares a esta hifa são detectadas (O'CONNELL; BAILEY; RICHMON, 1985).

2.4 Controle

A mancha angular e a antracnose do feijoeiro são doenças de difícil controle devido, principalmente, à eficiente transmissão do patógeno pela semente, à capacidade de sobrevivência durante vários meses em restos culturais infectados no solo e à elevada variabilidade fitopatogênica que apresentam. No entanto, para seu controle, recomenda-se o uso de sementes certificadas, para evitar a introdução dos patógenos em locais onde ainda não ocorrem ou reduzir o inóculo inicial em campos já contaminados. O uso de cultivares com resistência genética, as práticas culturais, a utilização do controle biológico e o controle químico são também indicados. A eficácia dessas estratégias depende de fatores ambientais locais, mas, muitas vezes, não atinge um nível de controle suficiente que evite os prejuízos. É por isso que, mesmo não sendo a alternativa ideal de controle, o tratamento químico ainda é o mais utilizado (RIBEIRO et al., 2011; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Contudo, é importante lembrar que o uso de fungicidas sintéticos pode levar à seleção de patógenos resistentes (BRENT; HOLLOMON, 1998), à preocupação do público com os resíduos tóxicos nos alimentos (ANKLEY et al., 2005; EL-NAHHAL, 2004), à poluição ambiental e à elevação dos custos de produção (GHINI; KIMATI, 2000; MIKLAS et al., 2006). No relatório da National Academy of Sciences dos Estados Unidos, em 1986, foi indicado que resíduos de fungicidas nos alimentos representam um grave risco cancerígeno. Portanto, fungicidas sintéticos são suspeitos em nossa cadeia alimentar e a

pressão está aumentando para encontrar alternativas mais seguras. Por tudo isso é necessário criar novos métodos alternativos de controle de fitopatógenos que sejam seguros para os seres humanos e para o ambiente (RESEARCH COUNCIL; BOARD OF AGRICULTURE, 1987).

Além disso, são conhecidas três tendências evolutivas que causam sérios problemas de doenças de plantas: a evolução ou adaptação de patógenos para causar doenças antes desconhecidas; o surgimento de raças que superam a resistência à infecção que foi produzida em plantas e o desenvolvimento de raças resistentes a tratamentos químicos. Os três oferecem sérias ameaças à produção agrícola (HOLLOMON; BRENT, 2009).

Já no controle genético mediante uso de variedades resistentes, a alta variabilidade dos patógenos torna difícil encontrar cultivares de feijoeiro com ampla e duradoura resistência a estas enfermidades. Além disso, tendo em conta a presença de poucos genótipos com resistência a um grande número de patótipos, pode-se concluir que apenas a utilização da resistência vertical completa não é a melhor estratégia a ser utilizada no controle destas doenças. Sugere-se que sejam também utilizados, sempre que possível, como fonte de resistência, genótipos que apresentem os mais altos graus de resistência horizontal (SARTORATO; RAVA, 1993). Mas, existe grande dificuldade de associar em uma mesma cultivar, pelos métodos convencionais de melhoramento, genes de resistência a várias raças de diferentes patógenos e que, ademais, possuam características agronômicas e comerciais concernentes à maior aceitação do produto.

Materiais com essas propriedades, geralmente, não têm genes de resistência ou eles não são expressos no tempo e no local necessários à ativação de respostas de defesa da planta. Com o propósito de suplantar essa limitação, atualmente, a indução de resistência vem sendo muito estudada, sendo,

inclusive, utilizada em escala comercial com o objetivo de continuar plantando cultivares com elevado potencial agrícola, mas suscetíveis às doenças de maior importância econômica (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). O mecanismo da indução de resistência oferece novas possibilidades para uso prático na proteção de culturas contra doenças, tais como o uso de genes chaves em programas de melhoramento e a aplicação de agentes biológicos, bioquímicos ou sintéticos que ativem uma ou mais vias bioquímicas que lideram a ativação da defesa sistêmica da planta (LEADBEATER; STAUB, 2007).

Diversos componentes químicos presentes, principalmente nas plantas medicinais e/ou aromáticas, podem agir como substâncias fungitóxicas, à semelhança dos fungicidas sintéticos, ou como eliciadores de respostas de defesa da planta, em ambos os casos, sem poluir o ambiente nem contaminar os alimentos. Os óleos essenciais destas plantas são considerados como alternativa no controle de fitopatógenos (DUBEY et al., 2010; ISMAN, 2000), seja com ação fungitóxica (BÅNG, 2007; FIORI et al., 2000) ou pela indução de resistência na planta (ITAKO, 2008; QUINTANILLA; ROHLOFF; IVERSEN, 2002; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005; STANGARLIN et al., 1999).

2.5 Indução de resistência

Embora as plantas não possuam sistema imunológico evoluído, como nos mamíferos, elas podem se defender, em situações de estresse biótico ou abiótico, ao reconhecer e responder a estímulos percebidos. As plantas desenvolveram, durante o longo processo evolutivo por meio da seleção natural e de mutações, mecanismos diferenciados de defesa que, quando acionados, na

maioria das vezes por fungos, bactérias ou vírus, captam a agressão, traduzindo essa percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa (WIT, 2007).

O ataque de microorganismos patógenos às plantas, basicamente, é respondido mediante a defesa constitutiva ou passiva, dada pelas características estruturais já existentes, que atuam como barreiras físicas, obstaculizando a penetração, como cera, cutícula e por meio de compostos químicos pré-formados, que agem como biostáticos ou antibióticos ao patógeno, por exemplo, enzimas hidrolíticas, fenóis. Ocorre também pela defesa induzível ou ativa, expressa unicamente quando a planta é desafiada durante o ataque, podem ser estruturais, como a formação de papila e camada de cortiça, ou respostas bioquímicas com fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRP), entre outras (HAMMERSCHMIDT, 1999; LUCAS, 1998).

A combinação de características de defesa estruturais e reações bioquímicas que as plantas utilizam contra os patógenos diferem nas distintas interações patógeno-hospedeiro. Ainda, em se tratando dos mesmos patógenos e planta hospedeira, as combinações variam com a idade, o tipo de órgãos e de tecidos atacados e o estado nutricional da planta, assim como das condições ambientais (AGRIOS, 2005).

A resistência de plantas a doenças está relacionada a um conjunto de respostas de defesa ativadas na planta hospedeira, após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência em reconhecer a presença dos patógenos mediante mecanismos de percepção e transdução de sinais (TANI, 2001), que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas.

Como consequência, fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal são ativados, com a expressão subsequente de genes de defesa. A resistência é

manifestada, geralmente, como uma resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response* – HR), que resulta na rápida morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Outras reações de resistência podem incluir alterações estruturais, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (como H_2O_2 , O_2^-), a síntese de metabolitos secundários (por exemplo, fitoalexinas) e a produção de uma ampla variedade de moléculas de defesa, tais como as proteínas relacionadas à patogênese, ou PRPs (HAMMERSCHMIDT, 1999; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

A indução de resistência (IR) resulta da interação de uma planta com um adequado agente indutor. Esses indutores podem ser muito diversificados. Entretanto, em todos os casos, a interação com o agente indutor ou eliciador resulta na expressão de defesas e no *priming* (pré-condicionamento) dos tecidos saudáveis, para responder rapidamente à infecção (HAMMERSCHMIDT, 2007), aumentando a capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Essa resistência pode ser proporcionada por um agente indutor biótico ou abiótico, que aciona mecanismos de defesa latentes na planta (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982).

Em plantas suscetíveis, a resistência pode também ser ativada após a infecção localizada (lesão necrótica - HR) por patógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Isto é conhecido como resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance*, SAR) ou indução de resistência sistêmica (HAMMERSCHMIDT, 2007). A SAR tem sido demonstrada em várias interações hospedeiro-patógeno, conferindo uma proteção sistêmica de longa duração e amplo espectro, sendo efetiva contra doenças causadas por diferentes agentes bióticos. A indução da SAR resulta na inibição do desenvolvimento de patógenos e, portanto, na supressão ou na

diminuição dos sintomas de doenças, devido à ativação dos mecanismos de resistência das plantas, associada à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa (RYALS et al., 1996).

Muitos trabalhos em casa de vegetação foram realizados, em diversos patossistemas, demonstrando que a IR resulta na proteção de plantas contra uma ampla variedade de enfermidades e de insetos herbívoros, devido à ativação de diversos mecanismos de resistência. Existem relatos de diversas substâncias de origem biótica que agem como indutores de resistência (KUC, 2001). Vários pesquisadores, como, por exemplo, Tomlin (2001), têm registrado muitos patossistemas nos quais foi bem sucedida a indução de resistência utilizando o indutor sintético benzothiadiazole, ou BTH (Bion). Mesmo assim, a IR é ainda um novo conceito no manejo de doenças e, apesar de anos de pesquisa, permanece como um recurso pouco utilizado no manejo de doenças. Porém, tem sido adotado com sucesso em muitos sistemas de produção comerciais, como, por exemplo, em cereais na Europa e, obviamente, tem potencial para ser integrado em muitos outros.

Apesar de os fitopatologistas terem aprofundado a compreensão da natureza da IR, poucos trabalhos para incorporar estes conhecimentos à prática têm sido empreendidos. Programas de controle integrado de doenças poderiam ser aplicados em sistemas de produção agrícola ou hortícola. Melhoristas de plantas não têm realizado seleção sobre a base da resposta a eliciadores, nem provavelmente o realizarão, a menos que se possa provar a correlação com outros tratamentos benéficos, tais como aumento da tolerância à doença ou a expressão específica da resistência à doença. A IR oferece grande potencial e vantagens sobre protetores convencionais e a distribuição de simples genes reconhecedores do patógeno. As principais limitações são a falta do conhecimento das bases dos mecanismos de IR e como eles interatuam com

variáveis ambientais e, subsequentemente, como podemos superar esses problemas (LYON; NEWTON; WALTERS, 2007). É necessário dar grande ênfase aos meios pelos quais a IR pode ser incorporada na prática da proteção de cultivos. Sem tal informação, é improvável que ela se incorpore como uma tendência atual na proteção de cultivos (REIGNAULT; WALTERS, 2007).

O fenômeno da IR em plantas oferece novas possibilidades para uso prático na proteção de culturas contra doenças, como uso de genes chaves nos programas de melhoramento e aplicação de agentes biológicos, bioquímicos ou sintéticos que ativem uma ou mais vias bioquímicas que lideram a ativação da defesa sistêmica da planta (LEADBEATER; STAUB, 2007).

Algumas pesquisas de indução de resistência em feijoeiro contra algumas doenças fúngicas têm sido realizadas, mostrando que é uma alternativa promissora no contexto de uma agricultura sustentável. Assim, plantas de feijão comum induzidas com ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), aos nove dias, apresentando apenas o primeiro par de folhas, foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, aos 16, 21 ou 25 dias, de acordo com o tempo necessário para que o primeiro, o segundo e o terceiro trifólio, respectivamente, estivessem totalmente expandidos. Foi registrada redução de 97,6% no número de lesões e 91,6% no número de pontuações (flecks) para o primeiro trifólio. No segundo e no terceiro trifólios houve a ocorrência apenas de pontuações, com redução de 94,4% e 98,1%, respectivamente, o que caracteriza elevado aumento da resistência ao patógeno. Quando se inoculou, da mesma forma, *Uromyces appendiculatus*, foi observada redução aproximada de 66% no primeiro trifólio, 85,2% no segundo e de 99% no terceiro (DANN; DEVERALL, 1995).

Em outro estudo, Bigirimana e Höfte (2002) testaram doses diferentes de ASM, mergulhando as folhas em soluções contendo 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 μM e, três dias depois, inocularam *C. lindemuthianum*. Constatou-se que o

aumento da resistência era dependente da dose utilizada. Porém, doses de 100 e 1.000 μM tornaram as folhas menores e verd- escuras, o que os autores consideraram como fitotoxidez.

Ongena et al. (2002) promoveram indução de resistência em feijoeiro com *Pseudomonas putida* (isolado BTP1) e *P. aeruginosa* (isolado KMPCH) contra *Botrytis cinerea*. Eles encontraram redução da severidade da doença em 42% e 35%, respectivamente e consideraram que houve indução de resistência, uma vez que as bactérias indutoras e o patógeno foram inoculados em partes diferentes da planta.

Campos et al. (2004) pulverizaram plântulas de feijão com ácido salicílico e a raça delta de *Colletotrichum lindemuthianum* (fungo indutor), e registraram o aparecimento de uma isoperoxidase nos dois tratamentos, após inoculação do patótipo virulento. Maiores estímulos nas atividades enzimáticas foram observados nas cultivares com maior resistência à doença.

Em outro trabalho, a pulverização de 9 mg de quitosana por planta no estágio V3 reduziu em mais de 50% a severidade da antracnose, não causou fitotoxicidade e provocou o aumento na atividade de glucanase. O efeito protetor foi local e mais intenso no intervalo de tempo de quatro dias entre tratamento e inoculação, em casa de vegetação (PIERO; GARDA, 2008).

Conclui-se que diversos tratamentos induziram resistência à antracnose, produzindo respostas semelhantes de controle da doença.

Nesta área da indução de resistência, em trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos de plantas medicinais, foi demonstrado potencial no controle indireto de fitopatógenos, pela indução da síntese de fitoalexinas, que são compostos com características de eliciadores (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Em outra pesquisa desenvolvida, o ASM e o óleo essencial de tomilho elevaram a atividade da peroxidase em folhas de cafeeiro

aos 2 e aos 9 dias após a pulverização (PEREIRA et al., 2008). Itako (2008), utilizando óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, constatou aumento significativo, tanto local como de forma sistêmica, na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, com máxima resposta para ambas aos dois dias após a inoculação com *Alternaria solani*, em tomateiro. Ainda que escassos sejam os trabalhos de indução de resistência utilizando estes compostos, existe grande potencial como indutores e estudos mais detalhados precisam ser desenvolvidos.

2.6 Óleos essenciais

As substâncias químicas presentes nos óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais são elaboradas no seu metabolismo secundário e os princípios ativos, ou compostos orgânicos, são produzidos em rotas metabólicas constitutivas e, principalmente, relacionadas à diferenciação e ao desenvolvimento dos vegetais. A produção desses metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Cada um de tais processos é governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e ambiente (ROBERTS; SPEEDIE; TYLER, 1996).

Os óleos essenciais protegem as plantas atuando como antibacteriais, antifúngicos, antivirais, inseticidas e também protegem contra o ataque de herbívoros ao reduzir o apetite por tais plantas (BAKKALI et al., 2008).

Tais compostos, em sua maioria, derivam dos fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo estes últimos os predominantes. Apresentam-se como misturas de diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos,

furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2000).

As misturas complexas dos constituintes dos óleos essenciais, que podem ter entre 20 e 60 componentes, apresentam-se em diferentes concentrações, ocorrendo sempre dois ou três compostos majoritários e outros em menores quantidades (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2000). Os efeitos sinérgicos da diversidade de compostos maiores e menores dos óleos essenciais devem ser levados em consideração para explicar sua atividade antimicrobiana. Na natureza, os óleos essenciais realizam papel importante na proteção de plantas como antibacteriais, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, ao reduzir o apetite por tais plantas. Estes compostos orgânicos também podem atrair alguns insetos que ajudam na dispersão de pólen e de sementes, assim como repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais apresentam atividade biológica e servem como fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos de plantas (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; HOYOS et al., 2012; MIHALIAK; GERSHENZO; CROTEAU, 1991) e contra patógenos de humanos (PANDEY; RAI; ACHARYA, 2003). A maior parte dos trabalhos sobre os efeitos antimicrobianos de óleos essenciais foi conduzida sobre agentes patogênicos de humanos ou de alimentos (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006). Portanto, a necessidade de estudos aprofundados quanto à utilização destes compostos no tratamento de fitodoeças é fundamental na busca de melhores alternativas de controle.

Muitos trabalhos sobre a atividade biológica dos óleos essenciais já foram publicados. Porém, os dados, às vezes, mostram muita discordância sobre uma mesma essência. As razões para essa variabilidade podem ser compreendidas se forem levados em conta todos os fatores que influenciam a

composição química dos óleos, tais como climáticos, sazonais e condições geográficas, assim como o período de colheita e a técnica de destilação, entre outros (PANIZZI et al., 1993). O efeito da maturação da planta no momento da produção de óleo e a existência de diferenças quimiotípicas também podem afetar drasticamente esta composição (LAHLOU; BERRADA, 2003).

Vários estudos têm sido realizados com o propósito de desenvolver métodos e produtos alternativos para o controle das fitodoenças e, entre eles, os óleos essenciais têm apresentado potencial para este propósito (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; DUBEY et al., 2010). No marco da agricultura alternativa, alguns componentes dos óleos essenciais das plantas poderiam atuar seletivamente no controle de diversas fitodoenças, sem deteriorar o ambiente e a saúde humana. Nas últimas décadas, os produtos vegetais têm sido explorados como pesticidas botânicos porque são mais biodegradáveis do que os pesticidas sintéticos (DUKE, 1990).

Em diversas pesquisas tem-se ressaltado a ação Bång (2007) antimicrobiana dos óleos essenciais (OE) de diferentes plantas. Bång (2007) observou que vapores do OE de alho (*Allium sativum*) não estimularam a germinação dos conídios de *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* e de *Phoma foveata*, como foi observado com outros óleos, nem danificaram os tubérculos da batata. Constataram também que voláteis de OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) mostraram atividade antifúngica *in vitro* sobre os patógenos, mas não os controlaram *in vivo*. Em contraste, o OE da sálvia (*Salvia officinalis*) foi inefetivo *in vitro* contra *P. foveata* e *H. solani*, mas controlou o desenvolvimento da doença *in vivo* com doses similares. Os conflitos que aparecem ocasionalmente nos dois sistemas, *in vitro* e *in vivo*, demonstram que só o *screening in vitro* é insuficiente para avaliar o potencial antifúngico das substâncias a serem utilizadas na prática.

Kishore, Pande e Harish (2007) notaram que os óleos essenciais de cravo, de canela e o componente citral, na concentração de 0,01% (vol/vol), inibiram a germinação de conídios de *Cercospora arachidicola*, *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis* em mais de 90%, *in vitro*. O citral inibiu completamente o crescimento de *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *F. pallidoroseum* e *Phoma sorghina*. O óleo de cravo (1% v/v), pulverizado nas folhas 10 minutos antes da inoculação de *P. personata*, reduziu a severidade da mancha tardia do amendoim em até 58%.

Pereira et al. (2011) relataram que óleos essenciais de canela, citronela, erva-cidreira, cravo, árvore de chá, tomilho, nim e eucalipto inibiram a germinação dos conídios de *Cercospora coffeicola* com concentrações crescentes e os óleos de cravo, canela, nim, tomilho e capim-limão inibiram o crescimento micelial desse fungo.

Na avaliação do efeito inibitório do crescimento micelial por compostos voláteis de óleos essenciais, Lee et al. (2007) observaram que *Origanum vulgare* inibiu *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*; *Thymus vulgaris* inibiu *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *R. Solani*, e *Cymbopogon citratus* inibiu apenas *F. oxysporum*. Os principais constituintes encontrados foram geranial (43%), neral (30%) e limoneno (10%), em *C. citratus*; carvacrol (59%), ρ -cimeno (22%) e timol (6,5%), em *O. vulgare*, e timol (38%), ρ -cimeno (30%) e γ -terpineno (6,7%), em *T. vulgaris*.

Em experimento utilizando óleo essencial de tomilho a 800 ppm, Zambonelli et al. (1996) notaram redução no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*, causando degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular. Em estudos mais detalhados

observou-se que a ação dos OEs e de suas substâncias, em contato com os microrganismos, promove a permeabilidade das células, causando vazão dos seus constituintes (PIPER et al., 2001). Isso foi comprovado por Rasooli, Rezaei e Allameh (2006), por meio da microscopia eletrônica de transmissão, em que os óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* causaram danos severos às paredes, membranas e organelas celulares dos esporos de *Aspergillus niger*.

Rozwalka, Alves e Amaral (2010) observaram a acumulação de material eletrodense causado por *E. caryophyllata*, além de vazamento do conteúdo citoplasmático em algumas conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Colletotrichum musae* tratadas com óleos essenciais de *C. citratus* e de *Cinnamomum* sp. Os autores também visualizaram mudanças na parede celular e na membrana plasmática, assim como vacuolização do citoplasma em conídios tratados com óleos essenciais de *C. martini*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris*, *C. citratus* e *Cinnamomum* sp.

2.6.1 Cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thumb)

Na composição química do óleo essencial encontram-se, principalmente, eugenol (80-90%), acetato de eugenyl (7%), β -cariofileno (9%), ácido oleânico, α -humulen, ylangen, metoxy benzaldeído, benzilo alcohol, benzaldeído e cavychole, e substâncias das classes triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis. Algumas propriedades do eugenol são anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica e antibacterial (ÖZTÜRK; ÖZBEK, 2005). Outras atividades biológicas deste óleo, citadas na literatura, são antimicrobiana (VELLUTI et al., 2004), antioxidante (YANISHLIEVA et al., 2006), anestésica

(SEOL et al., 2007), anticarcinogênica ou quimiopreventiva (BANERJEE; DAS, 2005).

Em trabalho *in vitro* realizado por Souza et al. (2004), óleos essenciais de cravo impediram completamente o desenvolvimento de *A. niger*, *Eurotium repens* e *Rhizopus* sp., desde a concentração de 600 ug mL⁻¹ e de *Penicillium* spp., a partir de 800 ug mL⁻¹.

2.6.2 Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)

Com o uso das folhas já foram constatadas atividades anti-hipertensiva, sedativa, depressora do sistema nervoso central, analgésica, antimicrobiana e fungistática (LEWINSOHN et al., 1998). O óleo essencial desta planta apresenta, como constituintes majoritários, os monoterpenos citral, composto pela mistura dos isômeros geranial e neral (65-80%), além de limoneno, citronelal, mirceno e geraniol. É bastante empregado como aromatizante, em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes. Porém, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, servindo de material de partida para a síntese de importantes compostos, como iononas, metil-iononas e vitamina A (GUERRA et al., 2000).

As atividades antimicrobianas e antifúngicas do óleo essencial de *C. citratus* foram atribuídas ao citral (GUERRA et al., 2000). O mirceno não apresentou atividade antimicrobiana, mas, quando associado ao citral, potencializou seu efeito (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984).

2.6.3 Palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.)Wats.)

Os principais componentes do óleo essencial de palmarosa são registrados como geraniol (70-90%), geranyl acetato, apresentando menor quantidade de (E)- β -ocimeno, linalol e β -cariofileno, embora ocorram variações na composição química do óleo essencial, em virtude do material vegetal e do método de extração do óleo essencial (RAO; RAO; PUTTANNA, 2001).

Em estudo realizado por Prashar, Hili e Veness (2003), observou-se atividade antimicrobiana contra *S. cerevisiae* na concentração de 0,1%, apontando, como principal responsável, a presença de geraniol e de acetato de geraniol, compostos que apresentam alta capacidade antimicrobiana.

Nestes e em outros trabalhos sobre o efeito dos óleos essenciais já se começa a perceber o potencial destes compostos no controle de diversos fitopatógenos. No entanto, estudos *in vivo* são necessários para confirmar e afiançar esta promissória alternativa de manejo. Além disso, poucos são os trabalhos sobre o modo de ação desses óleos sobre os patógenos.

A utilização de substâncias naturais, como os óleos essenciais, é urgentemente necessária, pois é mais seguro para os consumidores e o ambiente, para o controle de doenças pós-colheita, e seu uso é eficaz contra os tipos selvagem e as linhagens resistentes aos pesticidas. Além disso, a demanda por redução na utilização de pesticidas na agricultura aumenta o interesse na possibilidade da aplicação dos óleos essenciais para controlar fitopatógenos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000). Pesticidas à base de óleos essenciais de plantas ou de seus constituintes demonstraram eficácia contra uma gama de pragas de produtos armazenados, pragas domésticas, insetos hematófagos e certas pragas agrícolas, bem como contra alguns fungos fitopatógenos responsáveis por doenças em pré e em pós-colheita (ISMAN; MACHIAL, 2006).

De acordo com Daferera, Ziogas e Polissiou (2003), os óleos essenciais, como agentes antimicrobianos, apresentam duas características principais. A primeira é a sua origem natural, que significa maior segurança para as pessoas e o ambiente. A segunda é que eles têm sido considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos patogênicos. Acredita-se que seja difícil selecionar patógenos resistentes à complexa mistura dos componentes do óleo, que aparentemente possuem diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana. Porém, pesquisa adicional é necessária, a fim de se obter informações sobre a eficácia prática dos óleos essenciais para proteger as plantas ou se eles apresentam efeitos fitotóxicos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). Nessa pesquisa, os autores conseguiram controlar fitopatógenos, tais como *B. cinerea* e *Fusarium* sp. e eliminaram *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* sob condições específicas de aplicação de óleos essenciais.

Pesticidas derivados de óleos essenciais têm vários benefícios importantes. Devido à volatilização rápida destes produtos, existe um nível muito mais baixo de risco para o ambiente, em comparação aos atuais pesticidas sintéticos. As populações de insetos parasitoides, predadores e polinizadores serão menos afetados como resultado da atividade residual mínima, ao produzir pesticidas à base de óleos essenciais, compatíveis com os programas de manejo integrado de pragas. Além disso, enquanto o desenvolvimento de resistência continua a ser um problema para muitos pesticidas sintéticos, é provável que a resistência se desenvolva mais lentamente (se acaso ocorrer) nos pesticidas à base de óleos essenciais, devido às complexas misturas dos constituintes destes óleos (ISMAN; MACHIAL, 2006).

É nos países em desenvolvimento, onde as plantas são endêmicas, que estes pesticidas podem vir a ter seu maior impacto. No entanto, o

desenvolvimento comercial de pesticidas à base de óleos essenciais de plantas pode enfrentar uma variedade de problemas. É evidente que onde a saúde humana e a animal são prioridades e os mínimos resíduos são desejáveis, vale a pena o esforço para superar esses desafios. Por conseguinte, espera-se que esses pesticidas encontrem sua maior aplicação comercial no controle de pragas urbanas, na saúde pública, na saúde veterinária e na proteção de produtos armazenados. Na agricultura, eles serão mais úteis para culturas protegidas, como as de estufa, para culturas de alto valor e dentro de sistemas de produção de alimentos orgânicos, nos quais poucos defensivos alternativos estão disponíveis. Como perigosos inseticidas convencionais são removidos do mercado e o custo do desenvolvimento de novos produtos continua a subir, é provável que os pesticidas à base de óleos essenciais ganhem aceitação adicional (ISMAN, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006).

2.7 Estudos ultraestruturais em fitopatologia

A microscopia eletrônica, desde seu início, nos anos 1940, deu uma contribuição substancial para o progresso da biologia e continua a ser importante ferramenta para a pesquisa biológica (ENGEL, 1979; THOMAS; MIDGLEY, 2011). No entanto, barreiras psicológicas tiveram de ser vencidas, pois existia preconceito sobre seu uso, já que os primeiros instrumentos foram construídos e utilizados por físicos (COLLIEX; MORY, 1994).

A declaração "ver para crer" expressa a importância da microscopia eletrônica em pesquisa básica e aplicada. Conforme documentado por livros de biologia modernos, micrografias eletrônicas são chave para a maioria das figuras que promovem a nossa compreensão de tecidos, células, organelas e nanomáquinas biológicas (MÜLLER; AEBI; ENGEL, 2008).

Bracker (1967) agrupou, numa revisão, diversos trabalhos sobre ultraestrutura de fungos, os quais foram realizados principalmente mediante microscopia eletrônica. Entre outras importantes observações, mostrou-se que a citologia de fungos patogênicos não difere significativamente da dos fungos não patogênicos. Também identificaram quase todas as organelas e inclusões em fungos, sendo que a maioria tem homólogos nas células vegetal e animal. Beckett, Heath e McLaughlin (1974) também documentaram, em seu atlas de ultraestrutura de fungos, importantes estudos detalhados destes microorganismos.

De maneira similar, na ampla revisão realizada por Huang (1986) sobre a ultraestrutura da penetração das bactérias em plantas, prioritariamente, foram documentadas as relações espaciais e as interações ultraestruturais entre bactérias e os tecidos do hospedeiro nos locais de infecção, registradas, principalmente, mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A histopatologia da interação patógeno-hospedeiro permite estudar o processo de infecção, esclarecendo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro. Nesse sentido, estudos ultraestruturais efetuados por Monda, Sanders e Hick (2001), sobre a infecção e a disseminação de *Phaeoisariopsis griseola* na folha de feijão (*Phaseolus vulgaris*), foram realizados mediante MEV e MET. Eles constataram que conídios de *P. griseola* germinam liberando um tubo germinativo no final do conídio ou em ambas as extremidades. O crescimento do tubo germinativo segue os contornos das células epidérmicas. Depois, o fungo entra na folha através dos estômatos e cresce, principalmente, intercelularmente entre as células do mesófilo e do tecido paliçádico. Ademais, o envelope cloroplástico e a membrana plasmática das células adjacentes se desintegram e há perda da integridade estrutural.

Observou-se que as hifas não penetram nas células hospedeiras, que o estroma foi posteriormente formado sobre a superfície foliar e, em condições favoráveis, conidióforos alongados formaram sinêmio. Mas, os conidióforos também surgiram através de estômatos.

Outros estudos ultraestruturais permitem evidenciar possíveis mecanismos estruturais de resistência. Claramente, Benhamou (2006) indica que, ao juntar métodos citoquímicos e imunocitoquímicos, abre-se um promissor estudo dos mecanismos pelos quais as plantas se autoprotegem da invasão dos patógenos. Em combinação com dados bioquímicos e moleculares, tais abordagens ultraestruturais têm provido úteis e, frequentemente, únicas informações, como a relação estrutura-função de um particular compartimento celular; a distribuição espaço-temporal de novas moléculas sintetizadas durante o curso da invasão do tecido vegetal; o potencial antimicrobiano de algumas moléculas de defesa da planta (por exemplo, compostos fenólicos, proteínas relacionadas à patogênese); o reforço da parede celular vegetal por compostos estruturais, tipo calose e lignina e o crucial papel do metabolismo secundário no processo de resistência. Baseados em pesquisas das consequências visíveis, citologicamente, das respostas das plantas ao estresse biótico, vários estudos contribuíram para dar maior luz à atividade funcional da célula vegetal, durante o processo de resistência.

Um claro exemplo disso é o estudo realizado em seis cultivares de feijão, na Itália. Iriti e Faoro (2003) verificaram, por meio de estudos histoquímicos, que a aplicação de ASM em cultivares suscetíveis de feijoeiro induziu resistência sistêmica contra a ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* e acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos vegetais. A produção de espécies reativas de oxigênio, uma das primeiras respostas de defesa ativada em plantas, pode acarretar a resposta de hipersensibilidade.

Entretanto, não foi observada morte celular nas plantas induzidas à resistência pela aplicação de ASM. Os autores inferiram que a resistência induzida contra a ferrugem do feijoeiro, por esse indutor abiótico, está particularmente relacionada com o aumento da atividade de peroxidases aniônicas, provida pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio. A produção dessas enzimas resultou no fortalecimento da parede celular do hospedeiro, constituindo uma barreira principal à infecção do patógeno durante a fase de penetração para formar haustórios e na emergência de *U. appendiculatus*, a partir da epiderme para o desenvolvimento de pústulas.

Os instrumentos de microscopia eletrônica podem ajudar também na elucidação dos mecanismos ou modos de ação de compostos com características antimicrobianas. No caso dos óleos essenciais, a seguir são apresentados alguns trabalhos que permitem vislumbrar a potencialidade destas técnicas.

Para conhecer o modo de ação do óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum* no controle de *Aspergillus flavus*, Tian et al. (2012) observaram, mediante MET, mudanças geradas na ultraestrutura do micélio submetido ao óleo. As principais mudanças foram que o plasmalema tornou-se áspero e com dobras contínuas no citoplasma e houve formação de lomassomos. Também foi notada a redução da matriz citoplasmática e que algumas mitocôndrias sofreram rompimento da estrutura interna, com diminuição da crista e lise completa. As maiores alterações foram intensa vacuolização do citoplasma e o destacamento da membrana plasmática da parede celular. Para confirmar o alvo do óleo na membrana plasmática, estudaram a inibição da síntese de ergosterol, maior componente esterol da membrana celular dos fungos e responsável por manter a função e integridade celular. Constatou-se que o óleo reduziu consideravelmente a quantidade do ergosterol, entre 56% e 92%.

Hoyos et al. (2012), investigando as alterações ultraestruturais em

conídios de *P. griseola*, relataram que óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* causaram graves danos à ultraestrutura celular, tais como vacuolização, vazamento do citoplasma, invaginação e ondulação do plasmalema, tornando inviável a germinação.

Em estudo realizado por Tyagi e Malik (2010), sobre o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida albicans*, por meio de observações em MEV, MET e MFA (microscópio de força atômica), foram constatadas alterações ultraestruturais no fungo pelo óleo, tanto nas fases líquido e de vapor, mostrando maiores danos nesta última. Nas micrografias de MEV visualizaram-se encolhimento, deformação e rompimento das células. Nas micrografias de MET, observaram-se distorção do plasmalema, desorganização do citoplasma, vacuolização e variação na espessura da parede celular que, em alguns lugares, parece quebrada. Nas micrografias de MFA, as células tratadas de *C. albicans* apresentaram menor altura que o controle, 2.000 nm e 700 a 100 nm, respectivamente, e também mostraram menor rugosidade que o controle.

3 Considerações finais

Os resultados deste estudo demonstraram o potencial antifúngico dos óleos essenciais, *in vitro* e *in vivo*, sem diferir do fungicida sintético, seja direta ou indiretamente, por meio de indução de respostas de defesa na planta. Óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini*, em baixa concentração, tornaram inviáveis os conídios de *P. griseola* e *C. lindemuthianum*, e, ao serem pulverizados em plantas de feijoeiro, diminuíram a severidade da antracnose.

O uso de óleos essenciais como fungicidas alternativos torna-se uma estratégia promissora devido ao fato de seus compostos serem biodegradáveis, terem baixa toxicidade em mamíferos, serem eficazes contra os tipos selvagens e as raças resistentes aos pesticidas, e serem economicamente viáveis. Por estas características, estes óleos destacam-se como compostos de grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado da antracnose do feijoeiro e em outros patossistemas.

Em casa de vegetação, a diminuição da severidade da antracnose em relação à testemunha, no experimento preventivo, principalmente e o aumento na atividade de enzimas de defesa podem indicar uma ação indutora de defesa no feijoeiro suscetível a *C. lindemuthianum*. É necessário realizar novos estudos com o óleo essencial como indutor de defesa, incluindo mais horários de coletas, junto com estudos histoquímicos e citoquímicos que permitam observar claramente a existência ou não de respostas de defesa estrutural, como papilas, calose e bioquímico como acúmulo de H₂O₂, entre outras.

Também é importante realizar estudos sobre o tempo de permanência dos resíduos do óleo essencial, assim como o tempo do efeito do óleo ou de seus constituintes na planta. Essas respostas permitiriam estabelecer o número de aplicações necessárias para a cultura, otimizando o controle da doença.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Academic, 2005. 922 p.

ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Ed.). **Interação planta-patógeno**: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 14, p. 433-466.

ANKLEY, G. T. et al. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 86, n. 2, p. 300-308, 2005.

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

BANERJEE, S.; DAS, S. Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 6, n. 3, p. 304-308, 2005.

BÃNG, U. Screening of natural plant volatiles to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogens *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. **Potato Research**, Wageningen, v. 50, n. 2, p. 185-203, 2007.

BECKETT, A.; HEATH, I. B.; MCLAUGHLIN, D. J. **An atlas of fungal ultrastructure**. London: Longman, 1974. 221 p.

BENHAMOU, N. Ultrastructural studies in plant disease resistance. In: TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. Berlin: Springer, 2006. chap. 4, p. 49-82.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, n. 2, p. 154-168, 2002.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 11-27.

BRACKER, C. E. Ultrastructure of fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 5, p. 343-372, Sept. 1967.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance**: the assessment of risk. Brussels: GPCF, 1998. 48 p. (FRAC Monograph, 2).

BULISANI, E. A. **Feijão carioca**: uma história de sucesso. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/FeijaoCarioca/index.htm>. Acesso em: 10 dez. 2009.

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.

CHAVES, G. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. (Ed.). **Bean production problems**: disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIAT, 1980. 424 p.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Programa de fríjol**. 2012. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/es/investigacion/Agrobiodiversidad/Frijol/Paginas/qu_e_hacemos.aspx>. Acesso em: 10 mar. 2012.

COLLIEX, C.; MORY, C. Scanning transmission electron microscopy of biological structures. **Biology of the Cell**, Paris, v. 80, n. 2/3, p. 175-180, 1994.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, G. M. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, London, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DAFERERA, J. D.; ZIOGAS, N. B.; POLISSIOU, G. M. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, 2000.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Effectiveness of systemic resistance in bean against foliar and soilborne pathogens as induced by biological and chemical means. **Plant Pathology**, London, v. 44, n. 3, p. 458-466, 1995.

DUBEY, N. K. et al. Exploitation of natural compounds in eco-friendly management of plant pests. In: GISI, U.; CHET, I.; GULLINO, M. L. (Ed.). **Recent developments in management of plant diseases**. Berlin: Springer, 2010. v. 1, part 3, p. 181-198.

DUKE, S. O. Natural pesticides from plants. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **Advances in new crops**. Portland: Timber, 1990. p. 511-517.

EL-NAHHAL, Y. Contamination and safety status of plant food in Arab countries. **Journal of Applied Sciences**, Faisalabad, v. 4, n. 3, p. 411-417, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção**. 2008. Disponível em: <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

ENGEL, A. The stem: an attractive tool for the biologist. **Ultramicroscopy**, Amsterdam, v. 3, p. 355-357, 1979.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Production crops. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlín, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, 2000.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GUERRA, M. J. M. et al. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana de Plantas Medicináis**, La Habana, v. 5, n. 3, p. 97-101, 2000.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. chap. 1, p. 1-9.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, 1982.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; BGRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 21, p. 1102-1157.

HERBES, D. H. et al. Detecção de *Curtobacterium fl accumfaciens* pv. *fl accumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 53-156, 2008.

HOLLOMON, D. W.; BRENT, K. J. Combating plant diseases: the Darwin connection. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 65, n. 11, p. 1156-1163, 2009.

HOYOS, J. M. Á. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 270-284, 2012.

HUANG, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 141-157, Sept. 1986.

INDEX FUNGORUM. c2008. Disponível em:
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. 2008. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1618&z=t&o=10>>.
Acesso em: 09 set. 2008.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BHT) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlín, v. 151, n. 3, p. 171-180, 2003.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: RAI, M.; CARPINELLA, M. C. (Ed.). **Naturally occurring bioactive compounds**. Amsterdam: Elsevier, 2006. chap. 2, p. 29-44.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, London, v. 19, n. 8/10, p. 603- 608, Sept. 2000.

ITAKO, A. T. **Óleo essencial de *Cymbopogon Citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

JESUS-JÚNIOR, W. C. et al. Effects of angular leaf spott and rust on yield loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 1045-1053, Nov. 2001.

JESUS JUNIOR, W. C. et al. Relationships between angular leaf spot, healthy leaf area, effective leaf area and yield of *Phaseolus vulgaris*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 109, n. 3, p. 625-632, 2003.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; HARISH, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 375-379, Apr. 2007.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, n. 1, p. 7-12, 2001.

LAHLOU, M.; BERRADA, R. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatised in Morocco. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 2, p. 124-127, 2003.

LEADBEATER, A.; STAUB, T. Exploitation of induced resistance: a commercial perspective. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. chap. 12, p. 229-241.

LEE, S. O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LEWINSOHN, E. et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Staff. *Poaceae*). **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 1, p. 35-39, 1998.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **African Plant Pathology**, Quenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.

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

LUCAS, J. A. **Plant pathology and plant pathogens**. 3th ed. Oxford: Blackwell, 1998. 274 p.

LYON, G.; NEWTON, A.; WALTERS, D. Induced resistance in crop protection: the future, drivers and barriers. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. chap. 13, p. 243-249.

MAHUKU, G. S. et al. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 12, p. 1383-1387, 2002.

MIHALIAK, C. A.; GERSHENZO, J.; CROTEAU, R. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implications for theories of plant chemical defense. **Oecologia**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 373-376, 1991.

MIKLAS, P. N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, 2006.

MONDA, E. O.; SANDERS, F. E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, London, v. 50, n. 1, p. 103-110, 2001.

MÜLLER, S. A.; AEBI, U.; ENGEL, A. What transmission electron microscopes can visualize now and in the future. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 163, n. 3, p. 235-245, 2008.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMON, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-89, 1985.

O'CONNELL, R. J. et al. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 181, n. 2, p. 204-212, 1996.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

ONGENA, M. et al. Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 3, p. 187-196, 2002.

OROZCO, C. S.; ARAYA, F. C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 589-593, 2005.

ÖZTÜRK, A.; ÖZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. **European Journal of General Medicine**, Van, v. 2, n. 4, p. 159-163, 2005.

PANDEY, A. K.; RAI, M. K.; ACHARYA, D. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 41, n. 6, p. 421-425, 2003.

PANIZZI, L. et al. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 39, n. 3, p. 167-170, 1993.

PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 359-414.

PEREIRA, B. R. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, 2008.

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, n. 1, p. 115-123, 2011.

PIERO, R. B.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de gluconase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, Washington, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, Out. 2001.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, New York, v. 63, n. 5, p. 569-75, 2003.

QUINTANILLA, P.; ROHLOFF, J.; IVERSEN, T. H. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. **Potato Research**, New York, v. 45, n. 2/4, p. 225-235, 2002.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 415-436.

RAO, E. V. S. P.; RAO, R. S. G.; PUTTANNA, K. Studies on in situ soil moisture conservation and additions of phosphorus and potassium in rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*) in a semi-arid tropical region of India. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 167-172, 2001.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalix* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, 2006.

REIGNAULT, P.; WALTERS, D. Topical application of inducers for disease control. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced**

resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 2007. chap. 10, p. 157-170.

RESEARCH COUNCIL; BOARD OF AGRICULTURE. **Regulating pesticides in food:** the Delaney Paradox. Washington: National Academy, 1987. 272 p.

RIBEIRO, F. E. et al. **Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 2011. 64 p. (EMBRAPA. Circular técnica, 89).

ROBERTS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 337 p.

ROZWALKA, L. C.; ALVES, E.; AMARAL, D. C. Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, Caracas, v. 35, n. 12, p. 912-915, 2010.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Determinação da resistência parcial do feijoeiro comum a *Isariopsis griseola*. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1993.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 300 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 50).

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 125-138.

SENA, M. R. et al. Envolvimento de agricultores no processo seletivo de novas linhagens de feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 407-412, mar./abr. 2008.

SEOL, D. W. et al. Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). **Aquaculture Research**, Hoboken, v. 38, n. 1, p. 45-49, 2007.

SILVA, K. J. D. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 10, p. 602-606, 2008.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 4, p. 241-247, 2007.

SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. v. 1. 821 p.

SOUZA, S. M. C. de et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 161, n. 2, p. 119-128, 2006.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 16-21, 1999.

STENGLEIN, S. et al. Angular leaf spot: a disease caused by the fungus *Phaeosariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 52, p. 209-243, 2003.

TANI, T. Perception of pathogen signals to initiate active defense. In: KEEN, N. et al. (Ed.). **Delivery and perception of pathogen signals in plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2001. chap. 1, p. 1-11.

THOMAS, J. M.; MIDGLEY, P. A. The modern electron microscope: a cornucopia of chemico-physical insights. **Chemical Physics**, Amsterdam, v. 385, n. 1/3, p. 1-10, 2011.

TIAN, J. et al. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, Barking, v. 130, n. 3, p. 520-527, 2012.

TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual**. 12th ed. Farnham: British Crop Protection Council, 2001. 1250 p.

TRIPATHI, M.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 39-46, 2008.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. **Micron**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 797-805, 2010.

VELLUTI, A. et al. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B-1 production by *Fusarium verticilloides* in maize. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 84, n. 10, p. 1141-1146, 2004.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600 p.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (Ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990. 228 p.

WIT, P. J. G. M. Visions & reflections (minireview): how plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.

YANISHLIEVA, N. V. et al. Natural antioxidants from herbs and species. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 9, p. 776-93, 2006.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 491-494, 1996.

SEGUNDA PARTE-ARTIGOS

Artigo 1, normas da revista *Ciência e Agrotecnologia* (artigo publicado)

Artigo 2, normas da revista *Crop Protection* (versão preliminar)

ARTIGO 1

**ANTIFUNGAL ACTIVITY AND ULTRASTRUCTURAL
ALTERATIONS IN *Pseudocercospora griseola* TREATED WITH
ESSENTIAL OILS**

Normas da revista científica Ciência e Agrotecnologia

(versão publicada)

ABSTRACT

Pseudocercospora griseola, the etiologic agent of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris*), is an important disease in all bean-producing regions worldwide and may cause extremely high yield losses. The control of this disease is made more difficult by the pathogen's genetic variability and the inefficiency of fungicides. In this study, of 26 essential oils tested at different concentrations, 25 demonstrated efficiency in affecting the germination of strains 63-31 and 63-63 of the pathogen, reaching inhibition levels of between 80% and 100%. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon martini* inhibited conidia germination at all concentrations; *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum* sp., *Thymus vulgaris*, *Matricaria recutita*, *Cordia verbenacea*, *Origanum vulgare*, *Cymbopogon nardus*, at 0.1 and 0.5%; and *Zingiber officinale*, *Mentha arvensis*, *Chamaecyparis pisifera*, *Lavandula officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum*, *Ocimum selloi*, *Baccharis dracunculifolia*, *Laurus nobilis*, *Citrus sinensis*, *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus*, at 0.5%. The main constituents identified were cinnamaldehyde in *Cinnamomum* sp.; eugenol in *E. caryophyllata*; *trans*- β -farnesene in *M. recutita*; pulegone in *C. verbenacea*; thymol in *T. vulgaris*; geraniol and neral in *C. citratus*, and geraniol in *C. martini*. Through transmission electron microscopy (TEM), it was verified that *C. citratus*, *C. martini* and *E. caryophyllata* presented direct fungitoxic action on *P. griseola*, causing severe damage to the cellular ultrastructure of the conidia, invalidating germination. These results indicated that essential oils are a promising alternative strategy for the control of angular leaf spot in bean, representing less risk to human health and the environment.

Index terms: angular leaf spot, transmission electron microscopy, alternative control of plant disease.

RESUMO

Pseudocercospora griseola é o agente etiológico da mancha angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), uma doença importante nas regiões produtoras de feijão em todo o mundo e que pode causar perdas de produtividade extremamente elevadas. O controle desta doença é dificultado pela variabilidade genética do patógeno e a ineficiência de fungicidas. Neste estudo, de 26 óleos essenciais testados em concentrações diferentes, 25 demonstraram eficiência em inibir a germinação das linhagens 63-31 e 63-63 do agente patogênico, atingindo níveis de inibição entre 80% e 100%. *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martini* inibiram a germinação de conídios em todas as concentrações; *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum* sp., *Thymus vulgaris*, *Matricaria recutita*, *Cordia verbenacea*, *Origanum vulgare*, *Cymbopogon nardus*, em 0,1% e 0,5%, e *Zingiber officinale*, *Mentha arvensis*, *Chamaecyparis pisifera*, *Lavandula officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum*, *Ocimum selloi*, *Baccharis dracunculifolia*, *Laurus nobilis*, *Citrus sinensis*, *Melaleuca alternifolia* e *Eucalyptus globulus*, em 0,5%. Os principais constituintes identificados foram cinamaldeído, em *Cinnamomum* sp.; eugenol, em *E. caryophyllata*; trans- β -farneseno, em *M. recutita*; pulegona, em *C. verbenacea*; timol, em *T. vulgaris*; geranial e neral, em *C. citratus* e geraniol, em *C. martini*. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), verificou-se que *C. citratus*, *C. martini* e *E. caryophyllata* apresentaram ação antifúngica direta sobre *P. griseola*, causando graves danos na ultraestrutura celular dos conídios, invalidando a germinação. Estes resultados indicaram que os óleos essenciais são uma estratégia alternativa promissora para o controle da mancha angular do feijoeiro, o que representa menos risco para a saúde humana e o ambiente.

Termos para indexação: mancha angular, microscopia eletrônica de transmissão, controle alternativo de doenças de plantas.

INTRODUCTION

Angular leaf spot (ALS), caused by *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, is the most widespread disease in all bean-producing regions worldwide. According to the Commonwealth Mycological Institute (CMI), this disease occurs in more than 60 countries (Sartorato & Rava, 1994) and, under favorable environmental conditions, yield losses may reach 80% (Jesus-Júnior et al., 2001; Stenglein et al., 2003; Paula-Júnior & Zambolim, 2006). Although application of fungicides is the primary measure taken to control plant diseases, their continuous and indiscriminate use has caused contamination by waste, environmental pollution and the selection of resistant populations of pathogens. Chemical control carries considerable environmental and financial costs (Miklas et al., 2006). Due to the high genetic variability of *P. griseola* (Brock, 1951; Pyndji, 1993; Pastor-Corrales et al., 1998; Orozco & Araya, 2005; Stenglein & Balatti, 2006; Silva, et al., 2008), genetic control through the use of resistant cultivars is very difficult.

The inefficiency of pesticides in the control of ALS and the lack of resistant cultivars, as well as market demands in food production and the need to achieve environmental sustainability, food security and economic viability, have all made the use of technology that is non-aggressive to the environment and human health into a major challenge for bean producers. Considering these problems, it has become vital to develop strategies based on the rational use of fungicides or to replace them with alternative products (Christian & Goggi, 2008; Ghini & Kimati, 2000). Essential oils have shown biological activity that may offer an alternative strategy in the control of plant pathogens (Mihaliak et al., 1991; Stangarlin et al., 1999; Isman, 2000; Kotzekidou et al., 2008) due to fungitoxic action (Fiori et al., 2000; Bonaldo et al., 2004; Bang, 2007) or by

inducing resistance in plants (Schwan-Estrada, 2003; Quintanilla et al., 2002; Pereira et al., 2011).

The essential oils extracted from medicinal, aromatic and ornamental plants have shown efficiency in controlling plant pathogens (Shahi et al., 2003; Soylu et al., 2006; Lee et al., 2007; Barrera-Necha et al., 2008). The effects of essential oils have been studied at the ultrastructural level for some pathogens (Zambonelli et al., 1996; Rasooli et al., 2006; Rozwalka et al., 2010). However, there are no reports about the antifungal activity and the mode of action of essential oils on *P. griseola*. This study aimed to evaluate (i) the antifungal activity of 26 essential oils on germination of *P. griseola* conidia, strains 63-31 and 63-63; (ii) the effect of the essential oils of *Cymbopogon martini*, *Eugenia caryophyllata* and *Cymbopogon citratus* on conidia at ultrastructural level by transmission electron microscopy (TEM), and (iii) to identify the chemical constituents of essential oils with fungitoxic activity against this plant pathogen.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates

Two monosporic isolates of *P. griseola* were employed, classified as pathotypes 63-31 and 63-63, from the mycology collection of the Institute of Biotechnology Applied to Agriculture (BIOAGRO) at the Federal University of Viçosa (Viçosa, Minas Gerais State, Brazil). Conidia were obtained by culturing the fungus on bean leaf-dextrose-agar medium in a growth chamber (Fanem, São Paulo, Brazil) at 24 ± 2 °C. After approximately 15 days, spore suspension was prepared by adding 5–10 mL of sterile distilled water to each Petri dish and scraping the surface of the culture with a spatula.

Essential oils

The essential oils extracted from 26 medicinal, ornamental, aromatic, or forest species representative of the families Apiaceae (*Pimpinella anisum* L.), Asteraceae (*Baccharis dracunculifolia* DC., *Matricaria recutita* L.), Boraginaceae (*Cordia verbenácea* DC.), Cupressaceae (*Chamaecyparis pisifera* (Siebold & Zucc.) Endl., *Chamaecyparis plumosa* Hort. ex Beissn.), Lamiaceae (*Lavandula officinalis* Chaix ex Vill., *Mentha arvensis* L., *Ocimum basilicum* L., *Ocimum selloi* Benth., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L.), Lauraceae (*Cinnamomum* sp., *Laurus nobilis* L.), Myrtaceae (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, *Eucalyptus globulus* Labill., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Melaleuca alternifolia* Cheel), Poaceae (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats., *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), Rutaceae (*Citrus limon* (L.) Burm.f., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), Verbenaceae (*Lippia citriodora* Kunth) e Zingiberaceae (*Zingiber officinale* Roscoe).

Essential oils from *L. officinalis*, *O. selloi*, *O. vulgare* and *Cinnamomum* sp. were extracted by hydrodistillation for 3 h in a Clevenger-type apparatus. Flowers and leaves from *L. officinalis*, and leaves from *O. selloi* and *O. vulgare* were collected at the Medicinal Plants Nursery of the Agricultural Department, Federal University of Lavras, Minas Gerais State, Brazil, at vegetative stage, and cinnamon bark was purchased in a natural store in Lavras city. The remaining essential oils were supplied by Chamel Industry and Natural Products Commerce, Paraná State, Brazil (2010). All essential oils used in this work were kept in amber flasks and stored under refrigeration at 0 °C.

Screening the essential oils with *in vitro* antifungal activity

A total of 40 μL of essential oils at 0.04%, 0.2% and 1.0% and 40 μL of aqueous conidial suspension (2×10^4 conidia. mL^{-1}) prepared from 15-day-old cultures of strains 63-31 and 63-63 were placed inside each well of a 96-well plate. This mixture resulted in the final concentrations at 0.02% (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$), 0.1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) and 0.5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$). These treatments were prepared using sterile distilled water with Tween 20 at 1.0%. Sterile distilled water (40 μL) mixed with conidial suspension was used as control. In previous germinations tests comparing germination in water and water plus Tween-20 a 1.0%, it was observed that Tween showed non-toxic effects in both strains of pathogen. After 20 hours of incubation at 24 ± 2 °C and 12 h photoperiod, germination was interrupted by addition of 20 μL of lactoglycerol cotton blue. The percentage of germination was estimated by counting 50 randomly chosen conidia in 6 wells, totaling 300 conidia per treatment, under a light microscope. Conidia presenting differentiated germ tubes, independently of their size, were considered germinated. The experiment were carried out in a completely randomized design, as a factorial $2 \times 26 \times 3$ (strains x oil x concentrations) x 6 repetitions. Each well of the plate was an experimental unit.

Chemical composition of essential oils

C. martini (0.144 mg), *M. chamomilla* (0.127 mg), *E. caryophyllata* (0.200 mg), *T. vulgaris* (0.147 mg), *C. verbenacea* (0.179 mg), *C. citratus* (0.160 mg) and *Cinnamomum* sp. (0.118 mg) were dissolved in 0.5 mL of dichloromethane (CH_2Cl_2). These oils showed antifungal activity of more than 90%, when tested at 0.1%. One microliter of diluted essential oils was injected in gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). The gas chromatography operated with ultra pure helium as the

carrier gas at a flow rate of 1.8 mL.min⁻¹ and the separation was done on an Equity-5 capillary column (30 m x 0.22 mm I.D with 0.25 µm film thickness), with column oven at 60 °C for 2 min, heating at 3 °C.min⁻¹ up to 240 °C, remaining at 240 °C for 15 min. The temperature of the injector was 220 °C, split injection 1:15, manual injection, time run of 77 min. The mass spectrometry used a GC-MS interface, at 250 °C, with ion source at 200 °C and electron impact ionization at 70 eV. The compounds in essential oils were identified by comparing the similarity index of the mass spectra of relative area (%) with the data available in the library (Wiley 8) of GCMS.

Transmission electron microscopy (TEM) preparation

A conidial suspension (2 x 10⁴ conidia.mL⁻¹) of strains 63-31 and 63-63, prepared in sterile distilled water with Tween 20 at 1.0%, was mixed with 0.5 mL of the solutions of 0.2% essential oils of *C. martini*, *E. caryophyllata* and *C. citratus* to obtain a final concentration of 0.1%. For the control, 0.5 mL conidial suspensions were mixed with 0.5 mL of sterile distilled water. The treatments remained under agitation in an Orbital Shaker at 100 rpm and an average temperature of 25 ± 2 °C and, after 24 h, were centrifuged for 3 min at 6000 rpm, forming conidial masses. The masses were fixed in modified Karnovsky solution (glutaraldehyde at 2.5%, formaldehyde at 2.5% in sodium cacodylate buffer at 0.05 M, pH 7.2, and calcium chloride at 0.1 M) and kept in the refrigerator for 24 h (primary fixation). To form pellets, the conidial masses fixed in Karnovsky were centrifuged for 3 min at 6000 rpm. The supernatant was discarded, and the agarose gel at 1.0% was heated to about 45 °C and mixed with the pellets. The blocks of agarose formed were washed three times for 10 min in sodium cacodylate buffer at 0.05 M, for post-fixation in osmium

tetroxide at 2% in the hood. After a 4 h period, the blocks were washed three times in distilled water and submitted to contrast *en bloc* in an aqueous solution of uranyl acetate at 0.5% for one night in the refrigerator. The dehydration was done in a graded acetone series at concentrations of 25, 50, 75, 90 and 100% for 10 min each, except at 100%, which was dehydrated 3 times for 10 min each time.

Subsequently, the blocks were submitted to the embedding process, with the acetone being replaced by resin in an increasing gradient, remaining 8 h in Spurr resin (30%) and acetone (70%), 8 h in Spurr resin (70%) and acetone (30%) and twice for 24 h in pure Spurr resin (100%) at room temperature. Samples were transferred to silicone molds, prepared in advance and containing half of the volume with polymerized Spurr resin (100%), and covered with pure Spurr resin; these then remained in an oven at 70 °C for 48 h for polymerization. The blocks were trimmed with razor blades to remove the excess resin and to obtain a trapezoidal shape. Semithin sections (0.5 µm) were made on a Reichert-Jung (Ultracut E) ultramicrotome with a glass knife, collected with a gold ring and placed on glass slides. These were then dried on a metal plate at about 60 °C, covered with toluidine blue stain, heated on a metal plate until the formation of a gold border, washed with distilled water, dried on a hot plate and visualized by light microscopy for localization of fungal structures of interest and orientation of the ultrathin sections. The ultrathin sections (> 100 nm) were made with a diamond knife, collected on copper grids (300 mesh) previously coated with Formvar film, post-contrasted with aqueous solution of uranyl acetate (2%) and lead citrate (3%) (Reynolds, 1963) for 3 min on each, and washed with distilled water. For each treatment, the test was repeated twice and at least two blocks per replicate were examined. The observation of the samples and the recording of the images were performed in a Zeiss EM 109 transmission

electron microscope operating at 80 kv.

Statistical analysis

Data analysis was done using generalized linear models (GLMs), assuming a binomial distribution logit link function. The linear predictor was represented by $\log [p_i / (1 - p_i)] = \beta_{0i} + \beta_{1i} \cdot \sqrt{c}$, where p_i = probability of germination inhibition of conidia treated with essential oil i ($i = 1, 2, \dots, 26$) at concentration c ($c = 0.02, 0.1$ and 0.5%) and β_{0i} and β_{1i} are parameters that bring form to a relationship. The inferences were conducted considering the parameter of overdispersion (φ) estimated by Pearson residues. All analyzes were performed in R environment (2.15.0) for statistical computing R Development Core Team, 2012.

RESULTS AND DISCUSSION

Antifungal activity of essential oils on germination of P. griseola strains, in vitro

The results of analysis of deviance showed significant interaction between treatments and concentrations of the essential oils, indicating that differences in the percentage of germination occurred in function of the essential oil and concentrations used. So studies were done separately for each pathogen strain. The antifungal activity of essential oils in the germination of *P. griseola* strains, expressed by the percentage of conidial germination inhibition, was calculated based on average number of conidia that germinated from each strain, 63-31 (46.67) and 63-63 (31.75) and the untreated control (Table 1).

Table 1- Inhibition of conidial germination of *Pseudocercospora griseola* strains 63-31 and 63-63 by essential oils tested at 0.5, 0.1 and 0.02%, *in vitro*.

Essential oils	Concentrations (%)					
	0.5		0.1		0.02	
	Strains		Strains		Strains	
	63-31	63-63	63-31	63-63	63-31	63-63
<i>Cymbopogon citratus</i>	100.00	100.00	99.64	100.00	100.00	100.00
<i>Cymbopogon martini</i>	99.29	100.00	98.93	100.00	99.64	99.48
<i>Eugenia caryophyllata</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	58.21	99.48
<i>Cinnamomum</i> sp.	100.00	100.00	98.93	99.48	51.79	98.43
<i>Thymus vulgaris</i>	98.21	100.00	98.93	100.00	17.50	2.36
<i>Matricaria recutita</i>	100.00	100.00	93.57	100.00	3.57	13.91
<i>Cordia verbenacea</i>	98.93	99.48	94.64	96.33	4.29	10.24
<i>Origanum vulgare</i>	100.00	100.00	86.79	87.40	0.36	11.81
<i>Cymbopogon nardus</i>	100.00	100.00	83.21	89.50	6.79	-36.48
<i>Zingiber officinale</i>	99.29	100.00	50.71	95.28	1.79	-35.43
<i>Mentha arvensis</i>	99.64	100.00	35.71	99.48	14.29	59.58
<i>Chamaecyparis pisifera</i>	100.00	100.00	21.79	78.48	-0.71	25.98
<i>Lavandula officinalis</i>	100.00	100.00	16.07	80.05	1.43	61.15
<i>Ocimum basilicum</i>	97.86	100.00	26.79	57.48	26.79	36.48
<i>Pimpinella anisum</i>	98.57	99.48	38.21	67.45	12.14	25.98
<i>Ocimum selloi</i>	100.00	100.00	25.36	20.21	6.79	4.99
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	92.14	98.43	75.00	18.11	2.86	1.84
<i>Laurus nobilis</i>	98.21	99.48	24.29	13.91	3.21	-16.01
<i>Citrus sinensis</i>	98.21	100.00	29.64	-2.36	0.00	-0.26
<i>Melaleuca alternifolia</i>	95.36	96.85	-3.21	7.61	1.07	47.51
<i>Eucalyptus globulus</i>	86.43	94.23	2.14	-7.61	-1.43	6.56
<i>Chamaecyparis plumosa</i>	45.36	98.95	2.14	6.04	3.21	50.66
<i>Rosmarinus officinalis</i>	32.14	92.65	-2.50	-42.26	2.86	-2.36
<i>Lippia citriodora</i>	18.93	90.03	4.29	0.79	-1.79	-13.91
<i>Corymbia citriodora</i>	18.57	34.38	-2.14	-5.51	-1.43	38.06
<i>Citrus limon</i>	0.36	-35.96	0.36	-35.96	-0.71	-50.13

Essential oils of *C. citratus*, *C. martini* and *E. caryophyllata* were more

effective than the other treatments, showing at least 98% inhibition of conidial germination of strains 63-31 and 63-63 of *P. griseola* at all tested concentrations, except to *E. caryophyllata* at 0,02% in the strain 63-31. At 0.1%, *C. citratus*, *C. martini*, *E. caryophyllata*, *Cinnamomum* sp., *T. vulgaris*, *M. recutita* and *C. verbenacea* also showed antifungal activity against both strains.

The average germination inhibition values were higher than 93.57%. At 0.02%, conidia germination of strain 63-63 was almost totally inhibited by *C. citratus*, *C. martini*, *E. caryophyllata* and *Cinnamomum* sp. (Table 1). However, these two last essential oils did not show the same efficiency against strain 63-31, for which they only reduced inhibition to approximately 50%. A difference in inhibition response of the two pathogen strains was also observed more effectively on conidia treated with *M. arvensis*, *Z. officinale*, *C. pisifera*, *L. officinalis* and *B. dracunculifolia* at 0.1% and *C. plumosa*, *R. officinalis* and *L. citriodora* at 0.5%. The regression model allows us to observe these differences (Figure 1).

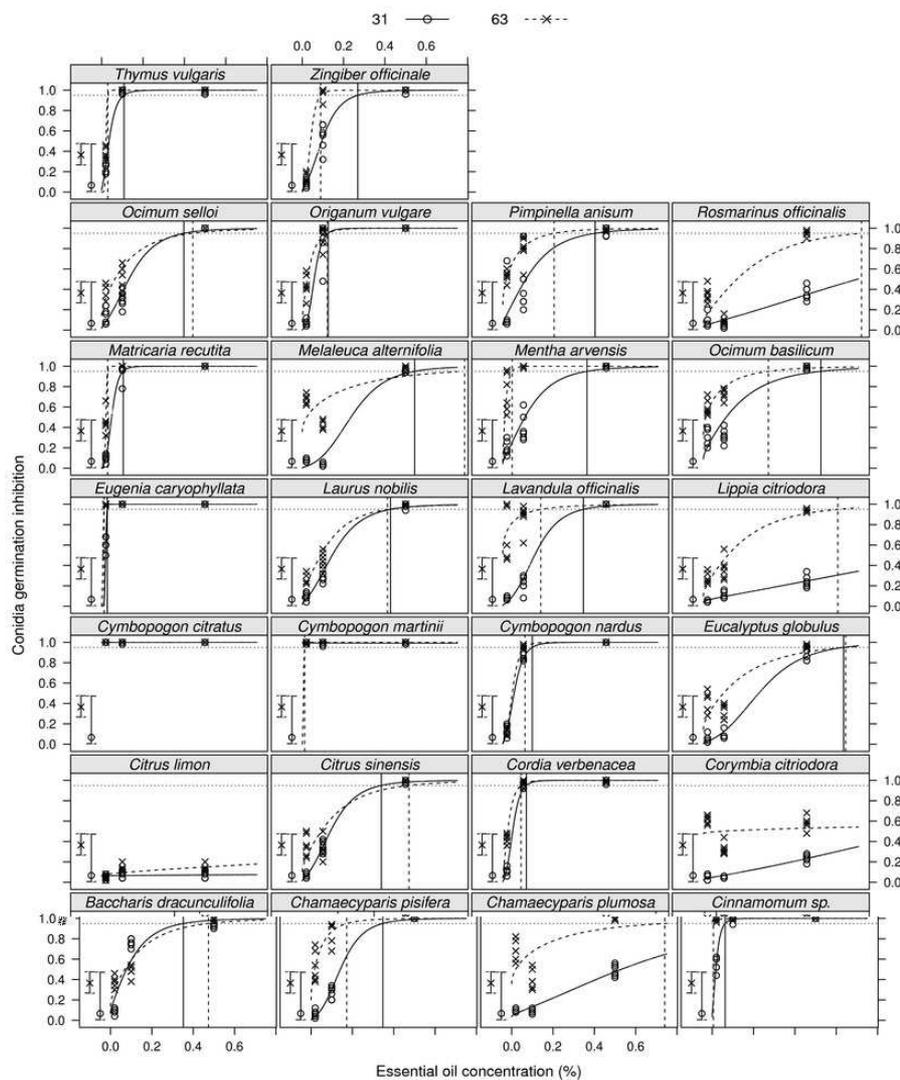


Figure 1 - Regression model fitted to data on number of germinated conidia. The dashed vertical lines represent the concentration that caused 95% of inhibition in strains 63-31 (⊖) and 63-63 (⊗) of *Pseudocercospora griseola*. A 95% confidence interval for the proportion of conidial germination in the control is represented along the regression curves. Points represent the proportion of germination observed.

It is also possible to observe that increasing the concentration of essential oil of *C. citriodora* and *C. limon* did not result in greater inhibition of the pathogen strains. At 0.5%, of the 26 essential oils screened, 21 promoted inhibition of conidial germination between 86 to 100% for both strains of the pathogen (Table 2).

At all the tested concentrations, some essential oils stimulated conidial germination of both strains, expressed by the negative sign. *C. nardus* (0.02%), *Z. officinale* (0.02%), *R. officinalis* (0.1%) and *C. limon* (0.1%, 0.02% and 0.5%) were the essential oils that most stimulated conidial germination of strain 63-63 (Table 1). Based on the estimated coefficients of the logistic regression model, by increasing the concentration of *E. caryophyllata* and *Cinnamomum* sp. from 0.02 to 0.03 and 0.06%, *M. arvensis*, *Z. officinale*, *O. vulgare* and *C. nardus* from 0.1 to 0.41, 0.27, 0.13 and 0.14%, respectively, the conidial germination inhibition of strain 63-31 could be 95%.

In this study, it was observed that increasing the concentration of most essential oils promoted their enhanced antifungal activity on *P. griseola* strains. However, the inhibitory effect promoted by essential oils was different for the two strains of the pathogen. Greater conidial germination inhibition was observed for strain 63-63, which is reported to be more aggressive than 63-31 in bean production in Brazil (Nietsche et al., 2001; Damasceno-Silva et al., 2008).

Table 2 -Estimation of coefficients of the logistic regression model for strains 63-31 and 63-63 of *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils *in vitro*.

Essential oils	Strain 63-31				Strain 63-63			
	β_0	β_1	c95%i	p0.5	β_0	β_1	c95%i	p0.5
<i>Citrus limon</i>	-2.73	0.23	587.39	0.07	-2.69	1.35	17.49	0.07
<i>Corymbia citriodora</i>	-3.74	3.61	3.43	0.23	-0.09	0.30	103.63	0.23
<i>Lippia citriodora</i>	-3.19	2.94	4.36	0.25	-2.18	6.36	0.65	0.25
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-3.44	3.98	2.57	0.35	-2.52	6.25	0.76	0.35
<i>Chamaecyparis</i>	-3.31	4.55	1.89	0.48	-0.57	4.09	0.74	0.48
<i>Eucalyptus globulus</i>	-4.98	9.62	0.68	0.86	-1.77	5.69	0.69	0.86
<i>Melaleuca alternifolia</i>	-5.67	11.68	0.54	0.93	-0.59	3.98	0.79	0.93
<i>Ocimum basilicum</i>	-2.32	6.98	0.57	0.93	-0.71	6.52	0.31	0.93
<i>Pimpinella anisum</i>	-2.95	8.82	0.45	0.96	-1.08	8.07	0.25	0.96
<i>Laurus nobilis</i>	-4.12	10.81	0.43	0.97	-2.57	8.58	0.41	0.97
<i>Mentha arvensis</i>	-3.09	9.46	0.41	0.97	-2.69	26.53	0.05	0.97
<i>Baccharis</i>	-2.60	9.35	0.35	0.98	-1.83	6.93	0.47	0.98
<i>Citrus sinensis</i>	-4.36	11.82	0.38	0.98	-2.14	7.07	0.52	0.98
<i>Lavandula officinalis</i>	-4.98	12.70	0.39	0.98	0.07	6.70	0.18	0.98
<i>Ocimum selloi</i>	-3.99	11.00	0.40	0.98	-1.79	7.14	0.44	0.98
<i>Chamaecyparis pisifera</i>	-5.21	13.84	0.35	0.99	-1.37	10.39	0.17	0.99
<i>Cymbopogon martini</i>	5.21	-0.51	19.50	0.99	-6.45	85.94	0.01	0.99
<i>Cinnamomum sp.</i>	-3.35	25.14	0.06	1.00	3.51	7.45	0.01	1.00
<i>Cordia verbenacea</i>	-5.41	24.72	0.11	1.00	-3.16	20.57	0.09	1.00
<i>Cymbopogon citratus</i>	6.30	1.42	5.56	1.00	22.63	0.00	*	1.00
<i>Cymbopogon nardus</i>	-4.80	20.52	0.14	1.00	-5.52	25.81	0.11	1.00
<i>Eugenia caryophyllata</i>	-	102.78	0.03	1.00	-6.45	85.94	0.01	1.00
<i>Matricaria recutita</i>	-6.26	28.48	0.10	1.00	-	110.48	0.03	1.00
<i>Origanum vulgare</i>	-6.27	26.02	0.13	1.00	-2.42	15.41	0.12	1.00
<i>Thymus vulgaris</i>	-4.00	21.13	0.11	1.00	-	111.47	0.03	1.00
<i>Zingiber officinale</i>	-4.29	13.95	0.27	1.00	-6.10	30.27	0.09	1.00

*203654410150349486686208.00.

c95%i represents the concentration of essential oils that inhibited 95% of conidial germination. c95%i was calculated as $p = \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot \sqrt{c}) / 1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot \sqrt{c})$. p 0.5 is a percentage of germination inhibition estimated for doses of 0.5%.

Chemical composition of essential oils

Identification and quantification of the main chemical constituents of essential oils can be seen in Table 3. The main constituents identified were cinnamaldehyde (92.36%) in *Cinnamomum* sp.; eugenol (91.94%) in *E. caryophyllata*; geraniol (75.92%) in *C. martini*; pulegone (68.96%) in *C. verbenacea*; geranial (58.89%) followed by neral (38.50%) in *C. citratus*; thymol (33.72%) in *T. vulgaris* and trans- β -farnesene (31.17%) in *M. recutita*.

The cytotoxic activity of essential oils in general is mostly due to the presence of phenols, aldehydes and alcohols (Sacchetti et al., 2005). This fact was corroborated in the present study, which identified the major components of the three essential oils that presented most inhibition of germination. These were geranial and neral (aldehyde) in *C. citratus*; eugenol (phenol) in *E. caryophyllata* and geraniol (alcohol) in *C. martini*. In the literature, only the main compounds of some other essential oils, including eugenol, thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, inter alia, have been studied.

The minor constituents of the essential oils studied here could also have a relatively strong antimicrobial effect (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008), which can indicate that these molecules have synergism in antimicrobial activity. The synergistic effects of the diversity of major and minor compounds of the essential oils should be taken into consideration to account for their antimicrobial activity.

Table 3 - Chemical composition of essential oils with antifungal activity of more than 90% on germination of strains 63-31 and 63-63 of *Pseudocercospora griseola*, when tested at 0.1%.

Essential oils Contents	Essential oils						
	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. verbenacea</i>	<i>C. citratus</i>	<i>E. caryophyllata</i>	<i>M. recutita</i>	<i>C. martini</i>	<i>Cinnamomum</i> sp.
benzaldehyde	-	-	-	-	-	-	0.28
α -bisabolol oxide A	-	-	-	-	17.77	-	-
α -bisabolol oxide B	-	-	-	-	10.43	-	-
bornyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.93
camphene	1.62	-	-	-	-	-	-
chamazulene	-	-	-	-	9.29	-	-
cinnamaldehyde	-	-	-	-	-	-	92.36
cinnamyl acetate	-	-	-	-	-	-	1.48
α -copaene	-	-	-	-	-	-	0.29
1,8-cineole	-	-	-	-	-	-	1.05
eugenol	-	-	-	91.94	-	-	-
<i>trans</i> - β -farnesene	-	-	-	-	31.17	-	-
<i>trans,trans</i> - α -farnesene	-	-	-	-	2.18	-	-
geranial	-	-	58.89	-	-	13.72	-
geraniol	-	-	2.61	-	-	75.92	-
α -humulene	-	-	-	1.51	-	-	-
hydrocinnamaldehyde	-	-	-	-	-	-	0.66
isoborneol	3.45	-	-	-	-	-	-
limonene	-	-	-	-	-	-	0.29
menthone	-	14.17	-	-	-	-	-
neral	-	-	38.50	-	-	5.71	-
neryl acetate	-	-	-	-	-	4.65	-
α - pinene	-	-	-	-	-	-	0.54
β - pinene	-	-	-	-	-	-	0.10
pulegone	-	68.96	-	-	-	-	-
sabinene	0.95	-	-	-	-	-	-
terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	0.28
α -terpineol	-	-	-	-	-	-	1.04
thymol	33.72	-	-	-	-	-	-
others	60.26	16.87	-	6.55	29.16	-	0.70

Content of constituents was determined from a peak relative to the total area in GCMS analysis.

Effect of essential oils on conidial ultrastructure

Cymbopogon martini, *C. citratus* and *E. caryophyllata* were selected for further tests, in function of their potential for inhibiting germination of the pathogen's conidia at concentrations of 0.02%, 0.1% and 0.5%, as observed in this experiment.

When both *P. griseola* strains studied here (63-31 (Figure 2A) and 63-63 (Figure 3A)) were treated with sterile water (control) the conidia kept the integrity of the cell wall, the plasma membrane, organized cytoplasm and some visible organelles, such as nucleus and mitochondria, showing well-defined envelopes. In contrast, conidia of both strains that were exposed to essential oils at 0.1% showed clear ultrastructural changes, which were observed by TEM.

The treatment of *P. griseola* conidia with *C. martini* essential oil revealed an altered cytoplasm, accompanied by a large empty area produced by previous cytoplasmic leakage (Figs. 2B, 2D, 3B and 3C). Vacuolisation was also frequently noted (Figs. 2C and 3C) and electron-dense aggregates covering parts of the wall and of the condensed cytoplasm (Figs. 2C and 2D) respectively.

Breakage of the plasma membrane and wall was caused in this conidium (Fig. 3C). The accumulation of electron-dense material characterized by an electron dark image, due to the contact with osmium, can indicate penetration by the essential oil. Some mitochondria underwent extensive disruption of the internal structure, with a decrease in the mitochondrial cristae (Figs. 2B, 2C, 3B, 3C).

In conidia treated with *C. citratus* essential oil, increased cytoplasmic condensation and aggregation was noted (Figs. 2E and 3D). It was also possible to see massive vacuolation of the cytoplasm with vacuole fusion, disruption of the internal mitochondrial structure (Figs. 2E, 2F and 3D), large empty spaces

caused by absence of the cytoplasmic matrix and lysis of membranous organelles (Figs. 2E, 2F, 2G, 3D and 3E) and electron-dense compounds over the aggregated cytoplasm, mitochondria and wall (Figs. 2E, 2F and 3D). Rupture of the plasma membrane and wall was observed (Fig. 3E), and the wall appeared thinner than normal. The cytoplasm in this conidium was quite disorganized.

E. caryophyllata essential oil caused disorganization of the cytoplasm, plasmalema retraction, undulation, and invagination in the treated conidia (Fig. 2J). Electron-dense material appeared covering all conidia (Figs. 2I and 3F), and over the wall (Fig. 3F).

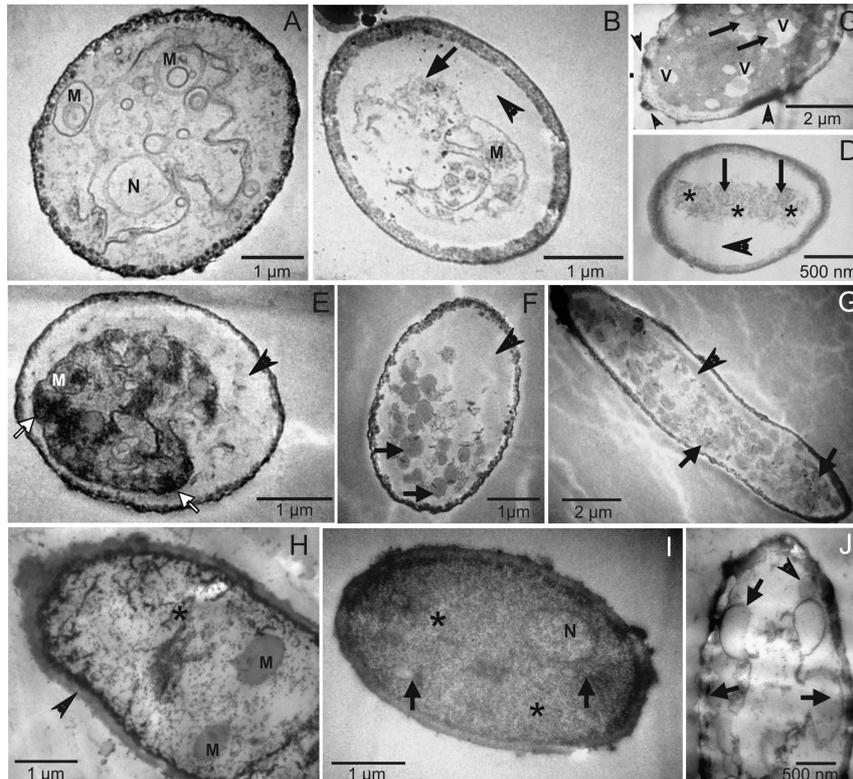


Figure 2 - Transmission electron micrographs of effect of essential oils (EO) at 0.1% on ultrastructure of *Pseudocercospora griseola* conidia, strain 63-31. A, Control, mitochondria (M), nucleus (N). B to D, treatment with *Cymbopogon martini* EO. B, the degraded cytoplasm (arrow), a large empty area (arrowhead) and mitochondria (M) are shown. C, condensation of cytoplasm, some vacuoles (V), mitochondria (arrows) and electron-dense material over the wall (arrowheads) are observed. D, electron-dense aggregates (asterisks) and large empty space are visible (arrowhead), and some organelles are not recognizable (arrows). E to G, treatment with *Cymbopogon citratus* EO. E, condensation of cytoplasm and electron-dense material (arrows), empty area (arrowhead), mitochondria (M) were visible. F and G, a large empty space (arrowheads) and numerous mitochondria with narrow bands of electron-dense compounds (arrows) are shown. H to J, treatment with *Eugenia caryophyllata* EO. H, the area in the wall appears with higher contrast (arrowhead), electron-dense aggregates (asterisk) and mitochondria (M) are observed. I, the nucleus is still visible (N) and other organelles are not well distinguished (arrows). Electron-dense aggregates (asterisks) appeared covering all conidia. J, plasmalema retraction (arrows), mitochondria-like organelle (arrowhead),

electron-dense material over the wall are observed in this conidium.

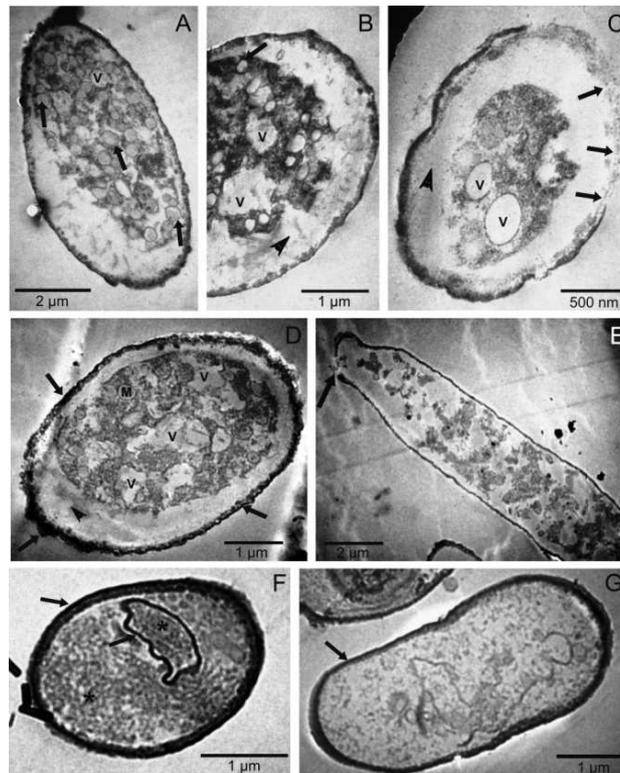


Figure 3 - Transmission electron micrographs of effect of essential oils (EO) at 0.1% on ultrastructure of *Pseudocercospora griseola* conidia, strain 63-63. A, Control, showing numerous mitochondria (arrows), vacuole (V). B and C, treatment with *Cymbopogon martini* EO. B, the cytoplasm is still visible and condensed but most organelles are affected as mitochondria (M); some vacuoles (V) are at times observed within electron-dense material. A large empty area (arrowhead) is shown. C, this conidium is altered; the organelles are difficult to distinguish. Some vacuoles (V), plasma membrane breakage (arrows) and (arrowhead) a large empty area is observed. D and E, treatment with *Cymbopogon citratus* EO. D, in this conidium the condensed cytoplasm, mitochondria (M), vacuoles (V), empty area (arrowhead) and electron-dense compounds (arrows) over the wall are visible. E, in this probably unviable conidium the organelles are not recognizable and the plasma membrane is broken (arrow). F and G, treatment with *Eugenia caryophyllata* EO. F, electron-dense material over the wall and envelope of organelle, and what appears to be the nucleus is observed (arrows). Electron-dense

aggregates (asterisks) appeared covering all conidia. G, electron-dense compounds over the wall and remains of organelles and/or cytoplasmic material are shown.

It should be emphasized that most of this damage is irreversible, and the changes showed general disorganization of the cytoplasm, as well as cytoplasm leakage, probably caused by loss of conidial membrane integrity, which could eventually lead to fungal cell death. These studies allow us to observe the complexity of the composition of essential oils, and to suggest that this complexity implies that there are multiple mechanisms of action.

The mode of action of essential oils commonly affects several targets at the same time, and no particular resistance or adaptation to essential oils has been described (Carson et al., 2002; Bakkali et al., 2008). In this regard, Denyer (1990) affirms that leakage of intracellular material is a general phenomenon provoked by many antimicrobial substances. Cell death may have been the result of the extensive loss of cell contents, the exit of critical molecules and ions, and the initiation of autolysis. Besides this, the permeabilization of outer and inner mitochondrial membranes leads to cell death by apoptosis and necrosis (Armstrong, 2006). It may be that chain reactions from the wall or the outer cell membrane invade the whole cell, through the membranes of different organelles, such as mitochondria and peroxisomes (Bakkali et al., 2008). In this study this membrane permeability was confirmed by observations made under transmission electron microscopy and by the high germination inhibition seen in treated conidia.

The antifungal activity of at least 93% in conidia treated with *Cinnamomum* sp., *E. caryophyllata*, *M. recutita*, *C. verbenacea*, *T. vulgaris*, *C. citratus* and *C. martini* at 0.1% corroborates similar studies carried out in several other pathosystems. In these, inhibition of germination or mycelial growth caused by pure essential oils, or by one or more of their constituents identified as

major in this study (Table 3), could be noted on applying different concentrations and in various forms (Wilson et al., 1997; Kasali et al., 2001; Saikia et al., 2001; Paranagama et al., 2003; Kishore et al., 2007; de Oliveira et al., 2010; Bassolé et al., 2011; Khan & Ahmad, 2011). Control of *P. griseola* using essential oils, however, is reported here for the first time.

Other important observations made in this work, were a discontinuous and highly undulating plasma membrane, and extensive disruption of the internal mitochondrial structure with a decrease in the cristae, which can indicate severely altered membranes in both strains of *P. griseola* exposed to essential oils. According to detailed research into membrane permeability (Sikkema et al., 1995; Vercesi et al., 1997), some chemical constituents of essential oils, such as typical lipophiles, can pass through the cytoplasmic wall and membrane, disrupt the structure of their different layers of polysaccharides, fatty acids and phospholipids and permeabilize them. Cytotoxicity appears to include such membrane damage. In eukaryotic cells, essential oils can provoke depolarisation of the mitochondrial membranes by decreasing the membrane potential, affecting Ca²⁺ ion cycling.

Transmission electron microscopy was seen to be a useful tool to elucidate the effects of *C. martini*, *C. citratus* and *E. caryophyllata* essential oil at 0.1% on conidia of *P. griseola* strains. It was observed that changes that occurred in the ultrastructure of this pathogen corroborate findings by several researchers in other pathosystems, as reported in Rozwalka et al. (2010); Rasooli et al. (2006); Tian et al. (2012); Avis et al. (2009). Scanning and transmission electron microscopy examinations reveal ultrastructural alterations in several compartments of the cell, such as plasma membrane, cytoplasm (swelling, shrivelling, vacuolations, leakage) and nucleus (Soylu et al., 2006; Santoro et al., 2007; Tyagi & Malik, 2010, Dan et al., 2010).

The determination of the biological activity of secondary metabolites from medicinal plants, with respect to direct antimicrobial activity or by activating defense mechanisms of the treated plants, as well as fractionation and identification of these metabolites, may help researchers gain more knowledge to improve their use as an alternative method for plant disease control (Stangarlin et al., 1999). According to Riefler et al (2009), considering the multiple biological activities of essential oils and of their chemical constituents, further research involving product formulations and effective blends and doses of isolated compounds should be performed, with the aim of protecting plants efficiently without exerting phytotoxic side-effects.

CONCLUSIONS

Fungitoxic potential is related to the chemical composition of the essential oil, as well as to the sensitivity of the pathogen to one or more constituents in different amounts.

The identification of secondary metabolites in the essential oils with antifungal activity constitutes a useful tool for the synthesis of new products by the chemical industry.

The direct fungitoxic action of several essential oils caused damage to cellular ultrastructure, consequently invalidating the germination of *P. griseola*; it presents a promising alternative for the control of angular leaf spot in bean and represents less risk to human health and the environment.

Acknowledgments

The authors thank Dra. Claudia Regina G. Labory (Pós-Doctor in Department of Soil Science, Federal University of Lavras, Campus

Universitário, 3037, CEP 37200000, Lavras, MG, Brazil) for her assistance and technical support in TEM and Cassius Nonato S. Freire (master student at Biology Department-UFLA) for help with the pathogen strains. Also, we acknowledge the doctoral scholarship and financial support granted by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a productivity grant for the second author and the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support to the Laboratory of Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis at the Federal University of Lavras, MG, Brazil.

REFERENCES

ARMSTRONG, J.S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **BioEssays**, Cambridge, v.28, p.253-260. 2006.

AVIS, T.J. et al. Ultrastructural Alterations in *Fusarium sambucinum* and *Heterobasidion annosum* Treated with Aluminum Chloride and Sodium Metabisulfite. **Phytopathology**, St. Paul, v.99, n.2, p.167-175. 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Orlando, v.46, p.446-475. 2008.

BÅNG, U. Screening of natural plant volatiles to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogens *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. **Potato Research**, New York, v.50, p.185-203. 2007.

BARRERA-NECHA, L. L. et al. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology**, London, v.7, p.174-178. 2008.

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

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v.29, p.128-134. 2004.

BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Sydney, v.17, p.25-30. 1951.

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

CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington DC, v.46, p.1914–1920. 2002.

CHRISTIAN, E.J., GOGGI, A.S. Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. **Crop Science**, Madison, v.48, p.1941-1951. 2008.

DAMASCENO-SILVA, K.J. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.156, n.10, p.602-606, 2008.

DAN, Y. et al. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**, London, v.29, p.295–299. 2010.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of biocides. **International Biodeterioration**, Barking, v.26, p.89-100. 1990.

DE OLIVEIRA, M.M.M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Vurrey, v.21, p.549-553. 2010.

FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, p.483-487. 2000.

- GHINI, R., KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. 78p.
- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, London, v.19, p.603- 608. 2000.
- JESUS-JÚNIOR, W.C. et al. Effects of angular leaf spott and rust on yield loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, p.1045-1053. 2001.
- KASALI, A. A., OYEDEJI, A. O., ASHILOKUN, A. O. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v.16, p.377–378. 2001.
- KHAN, M. S. A., AHMAD, I. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of Cinnamomum, Syzygium and Cymbopogon-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.19, n.1, p.48-55. 2011.
- KISHORE, G.K., PANDE, S., HARISH, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, p.375-379. 2007.
- KOTZEKIDOU, P., GIANNAKIDIS, P., BOULMATIS A., Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oil against foodborn pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.41, n.1, p.119-127. 2008.
- LEE, S.O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, London, v.23, p.97-102. 2007.
- MIHALIAK, C.A, GERSHENZO, J., CROTEAU, R. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implications for theories of plant chemical defense. **Oecologia**, Berlin, v.87, p.373-376. 1991.
- MIKLAS, P.N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v.147, p.105-131. 2006.
- OROZCO, S., ARAYA, C.M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v.30, p.589-593. 2005.

NIETSCHÉ, S. et al. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v.117, n.1, p. 77-84, 2001.

PARANAGAMA, P. A. et al. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.37, p.86-90. 2003.

PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C., SINGH, S. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v.103, p.161-171. 1998.

PAULA-JÚNIOR, T. J., ZAMBOLIM, L. Doenças, in: VIEIRA, C., PAULA-JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.), **Feijão**. Viçosa – UFV, Brazil, 2006. p.359-414.

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, n.1, p.115-123. 2011.

PYNDJI, M. M. Pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in the Great Lakes region, in: **PAN African Bean Pathology Working Group Meeting 1992**. Thinka, Kenya, CIAT, African Workshop Series 23, 1993.

QUINTANILLA, P., ROHLOFF, J., IVERSEN, T. H. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. **Potato Research**, New York, v.45, p.225-235. 2002.

RASOOLI, I., REZAEI, M. B., ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Vurrey, v.17, p.359-364. 2006.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.17, p.208-212. 1963.

RIEFLER, J; NOVAK, J; KOSCHIER, E. H. Components of essential oils in plant protection. **Zeitschrift für Arznei- Gewürzpflanzen**, Clenze, v.14, n.2, p.70-76. 2009.

ROZWALKA, L. C., ALVES, E., AMARAL, D. C. Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, Caracas, v.35, p.912-915. 2010.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, Barking, v.91, 621–632. 2005.

SAIKIA, D. et al. Comparative anti-fungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. **Current Science**, Bangalore, v.80, p.1264–1266. 2001.

SANTORO, G.F. et al. Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, p.783–790. 2007.

SARTORATO, A., RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa - SPI. 211-242. 1994.

SCHWAN-ESTRADA, KR.F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência - plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, p.124-125. 2003.

SHAHI, S.K. et al. Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruit. **BioControl**, Dordrecht, 48: 223-232. 2003.

SIKKEMA, J., DE BONT, J. A. M., POOLMAN, B., Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington DC, v.59, p.201–222. 1995.

SILVA, K. J. D. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.156, p.602-606. 2008.

SOYLU, E.M., SOYLU, S., KURT, S. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, The Hague, v.161, p.119–128. 2006.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.11, p.16-21. 1999.

STENGLEIN, S. et al. Angular leaf spot: a disease caused by the fungus *Phaeosariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in**

Applied Microbiology, New York, v.52, p.209-243. 2003.

STENGLEIN, S. A., BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.68, p.158-167. 2006.

TIAN, J. et al. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, Barking, v.130, p.520–527. 2012.

TYAGI, A.K., MALIK, A., In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. **Micron**, Oxford, v.41, p.797–805. 2010.

VERCESI, A.E. et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, New York, v.17, p.43–52. 1997.

WILSON, C.L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.204-210. 1997.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.491-494. 1996.

ARTIGO 2

Atividade antifúngica, alterações ultraestruturais por óleos essenciais a *Colletotrichum lindemuthianum* e controle alternativo da antracnose do feijoeiro

Normas da revista científica Crop Protection (versão preliminar)

Resumo

Este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a germinação e o crescimento micelial das raças 65 e 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, o controle da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação, verificando a eficiência dos óleos indutores de resistência e determinar as alterações ultraestruturais dos conídios expostos a eles. Dos 26 óleos essenciais, *C. citratus*, *C. martini*, *Cinamomum* sp., *T. vulgaris*, *E. caryophyllata* e *M. recutita* inibiram 95% da germinação dos conídios das raças 65 e 73 de *C. lindemuthianum*, em concentrações menores que 0,1%. O crescimento micelial das duas raças do patógeno foi inibido completamente pelos óleos de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* a 0,1%. No tratamento com fungicida, observou-se pouco crescimento micelial, após quatro dias. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que *C. citratus*, *C. martini* e *E. caryophyllata* apresentaram ação antifúngica direta sobre *C. lindemuthianum*, causando graves danos à ultraestrutura celular dos conídios, tais como vacuolização, vazamento do citoplasma e invaginação e ondulação do plasmalema. Tanto no experimento preventivo como no curativo, os óleos essenciais de *C. citratus* e *E. caryophyllata* reduziram a severidade da antracnose do feijoeiro. Foi registrado aumento na atividade de enzimas de defesa do feijoeiro pelo tratamento com óleo essencial de *C. citratus*.

Palavras-chave: enzimas de defesa, microscopia eletrônica de transmissão, doenças de plantas, *Phaseolus vulgaris*.

Abstract

The aim of this studies were to evaluate the antifungal activity of essential oils on the germination and mycelial growth of strains 65 and 73 of *Colletotrichum lindemuthianum*, in the control of anthracnose in greenhouse, evaluate the effect of oil of *C. citratus* in the activity of common bean defense enzymes and determine the ultrastructural changes in conidia exposed to oils. Of 26 essential oils tested, *C. citratus*, *C. martini*, *Cinamomum* sp., *T. vulgaris*, *E. caryophyllata* and *M. recutita*, at 0.1%, inhibited 95% of conidial germination of strains 65 and 73 of the pathogen. The mycelial growth of two strains of the pathogen was completely inhibited by the oils of *C. citratus*, *E. caryophyllata* and *C. martini*, at 0.1% (v/v). In the fungicide treatment was observed little mycelial growth after 4 days. Through transmission electron microscopy, it was verified that *C. citratus*, *C. martinii* and *E. caryophyllata* presented direct fungitoxic action on *C. lindemuthianum*, causing ultrastructural alterations included loss of membrane integrity, cytoplasmic leakage, and membrane retraction, undulation, and invagination. In both preventive and curative experiments, the essential oils of *C. citratus* and *E. caryophyllata* reducing anthracnose severity. It increased the activity of common bean defense enzymes by treatment with essential oil of *C. citratus*.

Keywords: defense enzymes, transmission electron microscopy, plant diseases, *Phaseolus vulgaris*.

1. Introdução

A antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara 1889, é uma das mais importantes doenças da cultura do feijoeiro, no mundo (Vieira et al., 2006). Esse patógeno, além de depreciar a qualidade do grão, sob condições favoráveis, pode causar perdas superiores a 80% na produção (Vieira et al., 2006; Ribeiro et al., 2011).

O controle da antracnose do feijoeiro não é fácil, devido, principalmente, à variabilidade patogênica que possui *C. lindemuthianum*, sendo os patótipos 65 e 73 encontrados com alta frequência nos estados produtores de feijão no Brasil (Abud et al., 2011; Pinto et al., 2012), e devido à disseminação através de sementes contaminadas. Cultivares resistentes podem ser utilizadas no controle dessa doença, entretanto, não existem cultivares resistentes a todas as raças conhecidas deste patógeno. Atualmente, o controle químico por meio de fungicidas ainda é o mais utilizado (Ribeiro et al., 2011), contudo, pode levar à seleção de patógenos resistentes (Brent & Hollomon, 1998) e a efeitos adversos à saúde humana e ao ambiente.

Esse fato tem incentivado a realização de estudos visando desenvolver métodos alternativos de controle da antracnose do feijoeiro, como o uso de pesticidas naturais (Isman & Machial, 2006; Dubey et al., 2010). Pesticidas naturais, como os óleos essenciais, podem ter duplo modo de ação, atuando diretamente contra o patógeno e indiretamente na planta, induzindo respostas de defesa ao patógeno. A indução de resistência como importante alternativa de controle caracteriza-se pela ativação de mecanismos de defesa que se encontram latentes nas plantas, em resposta a eliciadores abióticos ou bióticos, como óleos essenciais, oferecendo novas possibilidades para uso prático na proteção de culturas contra doenças (Karban & Kuc, 2000; Leadbeater & Staub, 2007).

Os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas podem apresentar ação eficaz contra patógenos fúngicos e bacterianos. Além disso, seus compostos são biodegradáveis, têm baixa toxicidade para mamíferos, o que os torna de grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado de doenças de plantas (Isman, 2000; Isman & Machial, 2006; Dubey et al., 2010).

Estudos ultraestruturais dos efeitos dos óleos essenciais sobre fitopatógenos têm sido registrados (Dan et al., 2010; Rozwalka et al., 2010; Hoyos et al., 2012). Estes óleos podem agir como substâncias fungitóxicas e antimicrobianas (Daferera et al., 2003; Barrera-Necha et al., 2008) ou pela indução de resistência nas plantas (Schwan-Estrada et al., 2003; Schwan-Estrada & Stangarlin, 2005; Pereira et al., 2008).

Existem poucos relatos na literatura sobre a atividade antifúngica e o modo de ação de óleos essenciais sobre *C. lindemuthianum*, que poderiam ser utilizados de forma alternativa, ecológica e econômica, dentro do manejo integrado da doença. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar (i) a atividade antifúngica de 26 óleos essenciais sobre a germinação e o crescimento micelial das raças 65 e 73 do patógeno, (ii) as alterações ultraestruturais dos óleos de *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllata* e *Cymbopogon martini* sobre conídios do fungo, (iii) o efeito destes no controle da antracnose e (iv) o efeito do óleo de *C. citratus* na atividade de enzimas de defesa do feijoeiro.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados do fungo

Dois isolados monospóricos de *C. lindemuthianum*, um da raça 65 (LV 136) e outro da raça 73 (LV 99), da coleção do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, foram utilizados neste estudo. Os isolados foram mantidos em meio de cultura M3 (Junqueira et al., 1994) e incubados, a 22 ± 2 °C, por 15-20 dias, com fotoperíodo de 12 horas.

2.2. Óleos essenciais

Foram utilizados óleos essenciais extraídos de 26 plantas medicinais, aromáticas ou florestais, representativas das famílias Apiaceae (*Pimpinella anisum* L.), Asteraceae (*Baccharis dracunculifolia* DC., *Matricaria recutita* L.), Boraginaceae (*Cordia verbenácea* DC.), Cupressaceae (*Chamaecyparis pisifera* (Siebold & Zucc.) Endl., *Chamaecyparis plumosa* Hort. ex Beissn.), Lamiaceae (*Lavandula officinalis* Chaix ex Vill., *Mentha arvensis* L., *Ocimum basilicum* L., *Ocimum selloi* Benth., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L.), Lauraceae (*Cinnamomum* sp., *Laurus nobilis* L.), Myrtaceae (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, *Eucalyptus globulus* Labill., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Melaleuca alternifolia* Cheel), Poaceae (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats., *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), Rutaceae (*Citrus limon* (L.) Burm.f., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), Verbenaceae (*Lippia citriodora* Kunth) e Zingiberaceae (*Zingiber officinale* Roscoe).

Os óleos essenciais das espécies de *Lavandula*, *Ocimum*, *Origanum* e *Cinnamomum* foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado. As três primeiras plantas foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil. As cascas de *Cinnamomum* foram adquiridas no comércio local, em Lavras. Os demais óleos essenciais foram fornecidos pela Chamel Indústria e Comércio Produtos Naturais Ltda., Paraná, Brasil. Todos os óleos foram mantidos em refrigerador, a 4 °C e protegidos da luz em frascos âmbar.

2.3. Efeito tóxico direto in vitro

2.3.1 Óleos essenciais na germinação de conídios de *C. lindemuthianum*

Os óleos essenciais foram diluídos em água destilada estéril e Tween 20 a 0,1%, para que as concentrações finais fossem em 0,02%, 0,1% e 0,5%. Aliquotas de 40 µL dos óleos essenciais diluídas e 40 µL da suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* a $1,2 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹, concentração utilizada em todos os experimentos, foram depositadas em placas de polipropileno de 96 cavidades. No tratamento testemunha foram utilizados 40 µL da suspensão de conídios e 40 µL de água destilada estéril.

A paralisação da germinação dos conídios foi realizada após 12 horas de incubação a 25 ± 2 °C, utilizando-se 20 µL do corante azul de algodão com lactoglicerol. Em microscópio estereoscópico foram avaliados 50 conídios por cavidade, em um total de 6 cavidades (300 conídios) de cada tratamento. Os conídios que apresentaram tubo germinativo maior do que o diâmetro do mesmo foram considerados como germinados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, em esquema fatorial

26 x 3 x 2 (óleos x concentrações x raças) e uma testemunha. Cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental.

A análise de dados foi realizada por modelos lineares generalizados, assumindo distribuição binomial para a resposta com função de ligação logit. O preditor linear é representado por $\log [p_i / (1 - p_i)] = \beta_{0i} + \beta_{1i} \sqrt{c}$, em que p_i = probabilidade de inibição da germinação do fungo, quando aplicado o óleo essencial i ($i = 1, 2, \dots, 26$) na concentração c , ($c = 0,02\%$, $0,1\%$ e $0,5\%$) e β_{0i} e β_{1i} são parâmetros que dão forma à relação. As inferências foram conduzidas considerando parâmetro de superdispersão (φ) estimado por meio dos resíduos de Pearson.

2.3.2 Óleos essenciais no crescimento micelial de *C. lindemuthianum*

Antes de realizar o experimento, foi medido o pH de cada tratamento (meio BDA mais ‘produtos’) com óleo essencial de *C. citratus*, pH 5,7; com óleo essencial de *E. caryophyllata*, pH 5,68; com óleo essencial de *C. martini*, pH 5,68; com fungicida azoxistrobina, pH 5,65; com ASM, pH 5,36; com água destilada estéril + Tween 20 a 0,1%, pH 5,66 e com água destilada estéril, pH 5,63.

Para cada raça de *C. lindemuthianum*, 65 e 73, foram utilizados os óleos essenciais *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini*, na concentração de 0,1%, pois apresentaram 95% de inibição da germinação na concentração de 0,1% ou menos. O ensaio foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com meio BDA. Os óleos essenciais, diluídos em água destilada e emulsificada pela adição de Tween 20 a 0,1%, foram adicionados ao meio antes de serem vertidos nas placas, após queda da temperatura para 50 °C, de modo que as concentrações finais atingissem as predispostas pelo ensaio. Como testemunhas foram

utilizados tratamentos com água destilada estéril e água destilada estéril mais Tween 20 a 0,1%. Como padrão de inibição, foi utilizado o fungicida azoxistrobina a $0,4\text{g L}^{-1}$ e, como padrão de indução de resistência, foi utilizado Bion (acibenzolar-S-metil, ASM) a $0,08\text{g L}^{-1}$, totalizando sete tratamentos.

No centro de cada placa foi colocado um disco de meio de 5 mm de diâmetro contendo micélio jovem de *C. lindemuthianum*. As placas foram incubadas a 22 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, até o final das avaliações. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito repetições. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri. As avaliações do diâmetro das colônias foram realizadas a cada dois dias, desde a inoculação até que o micélio do tratamento testemunha ocupasse toda a superfície do meio.

Com esses dados calculou-se o índice de crescimento micelial (ICM), de acordo a fórmula proposta por Maguire (1962).

2.3.3. Óleos essenciais na ultraestrutura de conídios de *C. lindemuthianum*

Este estudo foi realizado apenas com a raça 65 de *C. lindemuthianum*, que apresenta maior distribuição geográfica e elevada virulência no Brasil (Balardin & Kelly, 1997; Pinto et al., 2012). Os óleos de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* foram diluídos em Tween 20 a 0,1% e misturados à suspensão de conídios para que as concentrações finais dos óleos essenciais fossem a 0,1%. Como testemunhas, foram utilizados o fungicida azoxistrobina a $0,4\text{g L}^{-1}$ e água destilada esterilizada com Tween 20 a 0,1%.

Os tratamentos permaneceram sob agitação em Shaker Orbital, a 100 rpm e temperatura de 25 °C. Após 24 horas, foram centrifugados, por 3 minutos, a 6.000 rpm, formando massas de conídios, que foram fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 2,5% em tampão de cacodilato

de sódio a 0,05 M, pH 7,2 e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,001 M) e mantidas em geladeira, por 24 horas (fixação primária). Para a formação de pellets, as massas de conídios fixadas em Karnovsky foram centrifugadas, por 3 minutos, a 6.000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o gel de agarose a 1,0%, aquecido a 45 °C, foi misturado com os pellets. Os blocos de agarose formados foram lavados 3 vezes por 10 minutos em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, para pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%. Após 2 horas, os blocos foram lavados em água destilada, por 3 vezes e submetidos à contrastação em bloco, numa solução de acetato de uranila a 0,5%, por uma noite, em geladeira. A desidratação foi feita em série crescente de acetona, nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100%, durante 10 minutos em cada, exceto em 100%, com três tempos de 10 minutos.

Posteriormente, os blocos foram submetidos ao processo de inclusão, sendo a acetona substituída por resina em gradiente crescente, permanecendo 8 horas em resina Spurr (30%) e acetona (70%), 8 horas em resina Spurr (70%) e acetona (30%) e duas vezes de 12 horas em resina Spurr (100%), à temperatura ambiente. As amostras foram transferidas para moldes de silicone contendo metade do volume com resina Spurr (100%) endurecida e recobertas com resina Spurr, permanecendo em estufa, a 70%, por 48 horas, para a polimerização.

O desbaste dos blocos foi realizado com lâminas de barbear, removendo-se o excesso de resina para se obter a forma trapezoidal. Cortes semifinos (0,5 μm) foram feitos em ultramicrotomo Reichert-Jung (Ultracurt E) com navalha de vidro, coletados com anel de ouro e colocados em lâminas de vidro. Depois, foram secos em chapa a, aproximadamente, 60 °C, recobertos com azul de toluidina, lavados em água destilada, secos em chapa quente e visualizados em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos (>100nm) foram feitos

com navalha de diamante, coletados em grades de cobre (300 mesh) previamente recobertas com película de formvar, pós-contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 3%, por 3 minutos cada e lavados em água destilada (Reynolds, 1963).

Cada tratamento foi repetido duas vezes e os últimos dois blocos por repetição foram examinados. A observação das amostras e o registro de imagens foram realizados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 Kv.

2.4. Composição química de óleos essenciais

Óleos essenciais de *C. martini* (0,144 mg), *M. chamomilla* (0,127 mg), *E. caryophyllata* (0,200 mg), *T. vulgaris* (0,147 mg), *C. verbenaceae* (0,179 mg), *C. citratus* (0,160 mg) e *Cinnamomum* sp. (0,118 mg) foram dissolvidos em 0,5 mL de diclorometano. Estes óleos a 0,1% mostraram atividade antifúngica maior de 90%. Um microlitro de óleo essencial diluído foi injetado no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). O cromatógrafo gasoso utiliza hélio ultrapuro como gás de arraste com fluxo de 1,8 mL.min⁻¹. A separação foi realizada sobre uma coluna capilar Equity-5 (30 m x 0,22 mm I.D x 0,25 µm), com forno da coluna a 60 °C, por 2 minutos, aquecimento a 3 °C.min⁻¹ até 240 °C, permanecendo a 240 °C, por 15 minutos. A temperatura do injetor foi de 220 °C, com injeção split manual 1:15 e tempo de corrida de 77 minutos.

O espectrômetro de massa utilizou a interface GC-MS a 250 °C, com fonte de íons a 200 °C e modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os constituintes dos óleos foram identificados comparando-se o índice de

similaridade do espectro de massa da área relativa (%) com os dados disponíveis na biblioteca (Wiley 8) do GCMS.

2.5. Óleos essenciais no controle da antracnose do feijoeiro

Para verificar o efeito dos óleos essenciais no controle da antracnose do feijoeiro, foram realizados dois experimentos em casa de vegetação, um preventivo e um curativo. Foram realizadas quatro avaliações da severidade da antracnose, utilizando a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997). Com esses dados, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), conforme Shaner & Finney (1977). Quando houve significância pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

2.5.1. Experimento preventivo

Plantas de feijoeiro da cultivar Pérola, suscetível à raça 65 de *C. lindemuthianum*, foram cultivadas em vasos de 3 kg contendo substrato composto por Plantmax HT, terra e areia (2:1:1), mantidas em casa de vegetação (25 ± 5 °C), durante todo o período experimental. No estágio V3 foram pulverizadas com óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. Martini*, na concentração de 0,1% em água destilada com Tween 20 a 0,1%, ASM a $0,08 \text{ g L}^{-1}$, azoxistrobina a $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e água destilada, até o ponto de escorrimento, utilizando-se pulverizador manual. Sete dias após a aplicação, as plantas foram inoculadas via pulverização com a suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* e submetidas à câmara úmida, por 48 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados,

com quatro repetições e parcela experimental composta por um vaso contendo três plantas. As avaliações da severidade da antracnose iniciaram-se cinco dias após a inoculação.

2.5.2. Experimento curativo

Plantas de feijoeiro, obtidas e conduzidas como descrito no item 2.5.1, foram inoculadas no estágio V3 e, sete dias após a inoculação, foram pulverizadas com os mesmos tratamentos do item 2.5.1, com exceção do ASM. As avaliações da severidade da antracnose iniciaram-se sete dias após da inoculação.

2.6. Óleo essencial de Cymbopogon citratus na atividade de enzimas de defesa

A obtenção das plantas de feijoeiro e a inoculação foram realizadas como descrito anteriormente. Os tratamentos constituíram-se de ASM, óleo essencial de *C. citratus* e uma testemunha, todos não inoculados e inoculados com a raça 65 de *C. lindemuthianum*. Os tempos de coleta das amostras foliares para análise das enzimas de defesa foram 3, 4 e 5 dias após a pulverização dos tratamentos. Foram utilizadas três repetições, com parcela constituída de três plantas por tempo de coleta, em cada tratamento. A inoculação ocorreu aos três dias após a pulverização.

Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer (-80 °C), até o preparo do material para as análises bioquímicas. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1 g desse

pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou o tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 (5 mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se, por 10 segundos. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada, a 12.000 rpm, por 15 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A proteína total do extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina. A atividade de quitinase (CHI; EC 3.2.1.14) foi avaliada de acordo com a metodologia de Wirth & Wolf (1990), utilizando-se o substrato CM-Chitin-RBV. A atividade CHI foi expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto. A atividade de polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) foi avaliada pela mensuração da conversão do catecol em quinona (Gauillard et al., 1993), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $3.450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expressa pela formação de quinona por miligrama de proteína por minuto.

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada seguindo o método de Urbanek et al. (1991), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expressa como μmol de H_2O_2 oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) foi medida de acordo com Mori et al. (2001). Os valores da atividade da PAL foram expressos como mmol de ácido-transcinâmico por miligrama de proteína por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $30,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por quatro plantas por coleta. As atividades enzimáticas foram comparadas em cada época de coleta, utilizando-se o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Óleos essenciais na germinação de conídios de *C. lindemuthianum*

Os resultados da análise de deviance mostraram interação significativa entre os tratamentos e as concentrações dos óleos essenciais, indicando que diferenças na porcentagem de germinação ocorreram em função do óleo essencial e da concentração utilizada.

Na concentração de 0,5%, a inibição da germinação dos conídios variou entre 87% e 100%, para a raça 65 do patógeno e foi atingida por todos os 26 óleos essenciais, enquanto, para a linhagem 73, isso ocorreu com apenas 17 óleos. Os óleos essenciais de *C. citratus*, *C. martini*, *Cinamomum* sp., *T. vulgaris*, *E. caryophyllata* e *M. recutita* inibiram 95% da germinação dos conídios das raças 65 e 73 de *C. lindemuthianum*, nas menores concentrações dos óleos, compreendidas entre 0,01% e 0,07% (Tabela 1).

Tabela 1
Estimação dos coeficientes do modelo de regressão logística para as raças 65 e 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* tratadas com óleos essenciais *in vitro*.

Óleos essenciais	Raça 65				Raça 73			
	β_0	β_1	c95%i	p0.5	β_0	β_1	c95%i	p0.5
<i>Melaleuca alternifolia</i>	-1,31	4,52	0,89	0,87	-0,97	0,44	78,62	0,34
<i>Chamaecyparis pisifera</i>	-1,15	6,65	0,38	0,97	-0,36	0,15	457,63	0,44
<i>Pimpinella anisum</i>	-1,23	8,40	0,25	0,99	-0,03	0,60	24,54	0,60
<i>Ocimum selloi</i>	-1,84	7,16	0,45	0,96	-0,65	1,57	5,22	0,61
<i>Eucalyptus globulus</i>	-4,96	31,51	0,06	1,00	-1,06	2,17	3,40	0,62
<i>Corymbia citriodora</i>	-2,34	9,32	0,32	0,99	-1,19	2,48	2,78	0,64
<i>Citrus limon</i>	-2,14	13,04	0,15	1,00	-0,04	1,00	8,85	0,66
<i>Lippia citriodora</i>	0,79	5,86	0,14	0,99	-1,09	3,18	1,61	0,76
<i>Mentha arvensis</i>	-1,60	8,60	0,28	0,99	-1,63	3,98	1,32	0,77
<i>Ocimum basilicum</i>	-1,43	8,16	0,29	0,99	-0,73	3,81	0,93	0,88
<i>Baccharis</i>	-1,91	8,91	0,30	0,99	-1,79	5,65	0,70	0,90
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-0,97	5,86	0,45	0,96	-2,70	7,63	0,55	0,94
<i>Lavandula officinalis</i>	-2,48	8,59	0,40	0,97	-2,02	7,14	0,48	0,95
<i>Cymbopogon nardus</i>	-1,84	6,94	0,48	0,96	-1,81	7,05	0,45	0,96
<i>Chamaecyparis</i>	-1,25	6,82	0,38	0,97	-1,17	6,24	0,43	0,96
<i>Origanum vulgare</i>	-	117,15	0,03	1,00	-1,60	6,58	0,48	0,96
<i>Cordia verbenacea</i>	-0,94	6,89	0,32	0,98	-0,96	6,23	0,39	0,97
<i>Laurus nobilis</i>	-	115,83	0,03	1,00	-1,35	9,00	0,23	0,99
<i>Zingiber officinale</i>	-1,91	7,21	0,45	0,96	-	117,39	0,03	1,00
<i>Citrus sinensis</i>	-5,20	34,46	0,06	1,00	-2,43	11,53	0,22	1,00
<i>Matricaria recutita</i>	-2,82	21,11	0,07	1,00	-4,32	27,26	0,07	1,00
<i>Eugenia caryophyllata</i>	-	121,23	0,03	1,00	-4,68	29,33	0,07	1,00
<i>Thymus vulgaris</i>	-	113,49	0,03	1,00	-2,06	20,80	0,06	1,00
<i>Cinnamomum sp.</i>	-	116,48	0,03	1,00	-	117,23	0,03	1,00
<i>Cymbopogon martini</i>	-	106,49	0,02	1,00	-2,93	27,30	0,05	1,00
<i>Cymbopogon citratus</i>	23,63	0,00	*	1,00	-7,26	91,66	0,01	1,00

* 1835004501896020000000.00

c95%i representa a concentração do óleo essencial que inibe 95% da germinação dos conídios, foi calculado como $p = \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot \sqrt{c}) / 1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot \sqrt{c})$.

p 0,5 é a porcentagem de inibição da germinação estimada para a concentração de 0,5%.

Os óleos de *C. citratus*, *C. martini*, *Cinnamomum sp.*, *T. vulgaris*, *E. caryophyllata* e *M. recutita* inibiram mais de 95% da germinação dos conídios das duas raças do patógeno, em concentrações inferiores a 0,1% (Figura 1).

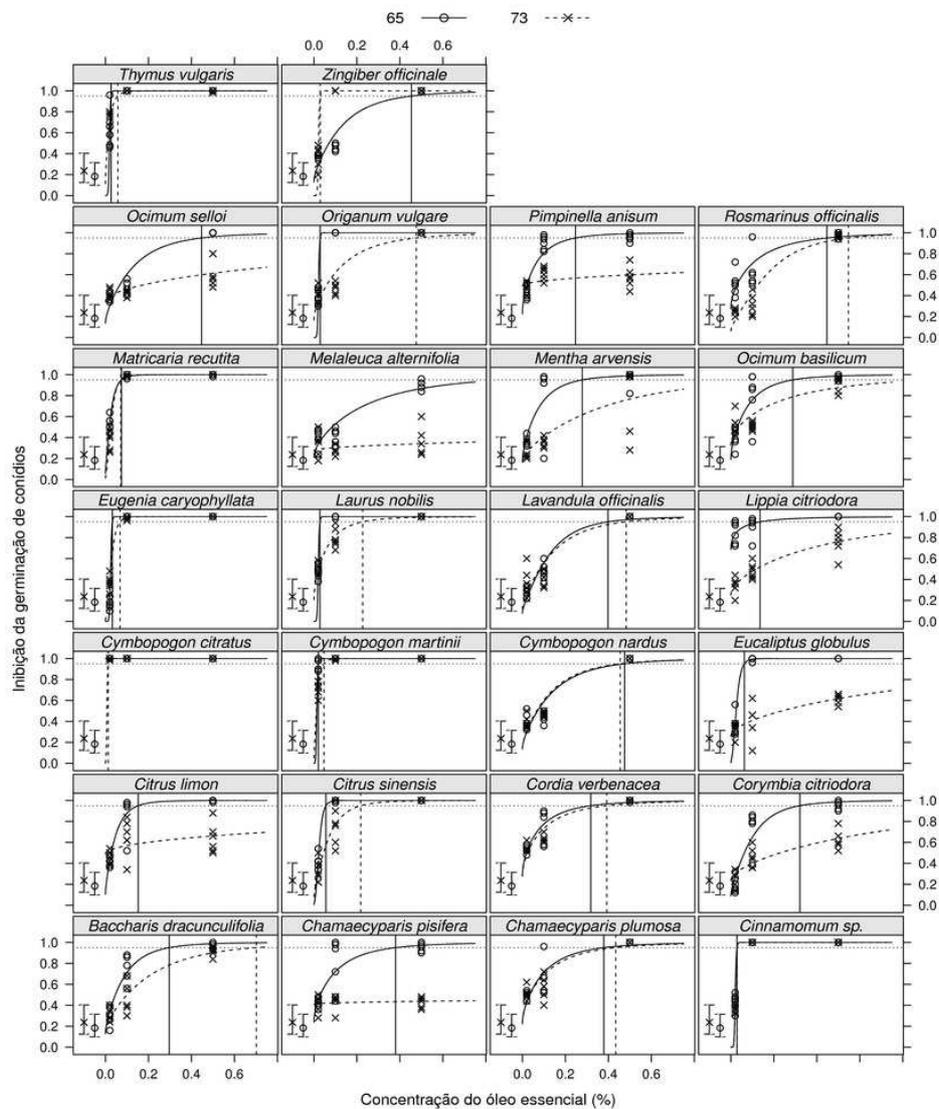


Fig. 1. Modelos de regressão ajustados aos dados de número de conídios germinados. As linhas tracejadas verticais representam a concentração que causa 95% de inibição da germinação nas raças 65 (○) e 73 (×) de *Colletotrichum lindemuthianum*. Os intervalos de 95% de confiança para a proporção de germinação nas testemunhas estão representados junto das curvas de regressão. Os pontos representam a proporção de germinação observada.

Foi notado, neste estudo, que o incremento da concentração da maioria dos óleos essenciais promove o aumento da atividade antifúngica sobre as duas raças de *C. lindemuthianum*. Não obstante, o efeito inibitório causado pelos óleos essenciais foi diferente para as duas raças do patógeno. Alta inibição da germinação dos conídios foi observada para a linhagem 65, reportada como de maior agressividade na produção de feijão no Brasil, pela ampla distribuição geográfica e a alta virulência (Talamini et al., 2004; Pinto et al., 2012).

3.2. Óleos essenciais no crescimento micelial de *C. lindemuthianum*

Para as duas raças do patógeno, o tratamento que apresentou maior ICM foi água destilada estéril + Tween, seguida do tratamento com água destilada estéril, sem diferirem entre si. O tratamento com ASM diferiu dos dois tratamentos anteriores, parecendo inibir levemente o crescimento do fungo. Nos demais tratamentos não houve crescimento.

Os óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* a 0,1% inibiram totalmente o crescimento do micélio das raças 65 e 73 de *C. lindemuthianum*. No tratamento com fungicida, observou-se pouco crescimento micelial após 4 dias, sem diferir estatisticamente dos óleos essenciais (Figura 2). De forma similar, Singh et al. (2002) observaram inibição total do crescimento micelial de *Colletotrichum falcatum* na presença do composto geraniol volátil, identificado como principal constituinte de *C. citratus*.

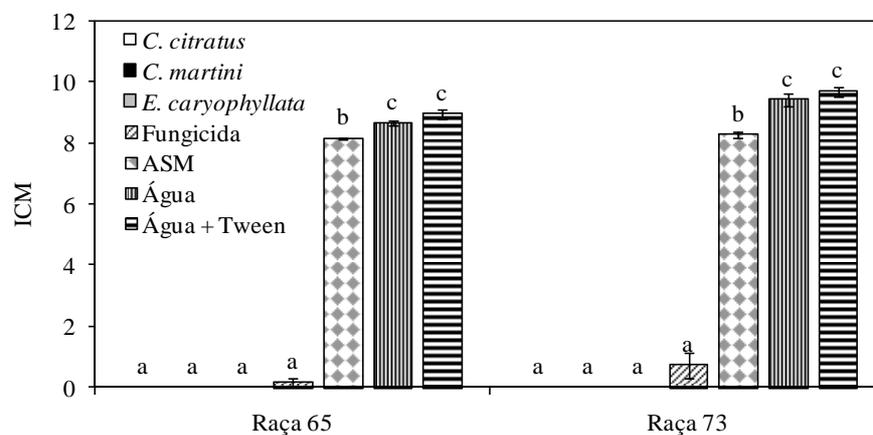


Fig. 2 Efeito dos óleos essenciais *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. Martini*, na concentração de 0,1%, do fungicida azoxistrobina a $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, acibenzolar-S-metil (ASM) a $0,08 \text{ g.L}^{-1}$, água destilada e água destilada mais Tween 20 a 0,1% no índice de crescimento micelial (ICM) de duas raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. Médias seguidas por mesma letra, dentro de cada raça, não diferem, pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). Barras de erros representam o erro padrão.

A inibição da germinação em 95% de conídios tratados com *C. citratus*, *C. martini*, *Cinnamomum* sp., *T. vulgaris*, *E. caryophyllata*, *M. recutita* e *C. sinensis* a 0,1% corrobora resultados de estudos semelhantes realizados em vários outros patossistemas. Nestes, a inibição da germinação ou do crescimento micelial, causada por óleos essenciais puros ou por seus constituintes, um ou mais, pode ser notada na aplicação de diferentes concentrações e em várias formas (Soylu et al., 2006; Lee et al., 2007; Khan & Ahmad, 2011).

3.3. Óleos essenciais na ultraestrutura de conídios de *C. lindemuthianum*

Os óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* foram selecionados devido ao seu potencial para inibir a germinação de conídios de *C.*

lindemuthianum nas concentrações de 0,02%, 0,1% e 0,5%, como registrado anteriormente.

Quando conídios de *C. lindemuthianum*, linhagem 65, foram tratados com água destilada estéril (testemunha), continuaram com a integridade da parede celular, do plasmalema e citoplasma organizado; algumas organelas, como núcleo e mitocôndrios, mostraram envelopes bem definidos. O mesmo não foi observado para os conídios tratados com fungicida e óleos essenciais a 0,1%, que apresentaram claras mudanças ultraestruturais (Figura 3A). Hoyos et al. (2012) também relataram danos ultraestruturais severos em conídios de duas raças de *Pseudocercospora griseola* tratados com óleos essenciais.

O tratamento de conídios de *C. lindemuthianum* com fungicida causou vacuolização do citoplasma, ondulação e invaginação do plasmalema, disrupção da estrutura interna das mitocôndrias, com diminuição das cristas (Figura 3B). Foi observado acúmulo de material eletrodense cobrindo partes do citoplasma condensado, devido ao contato com ósmio, podendo indicar penetração do agente fungitóxico, neste caso de origem sintética (Figuras 3B e 3C). Também se encontraram conídios bastante degenerados e com ruptura do plasmalema (Figura 3C).

Em conídios tratados com óleo essencial de *C. citratus*, foi notada intensa vacuolização e condensação do citoplasma (Figura 3D) e acúmulo de agregados eletrodensos cobrindo partes do citoplasma condensado, indicando penetração do agente fungitóxico de origem biótico (Figuras 3D e 3E). Observaram-se, ademais, conídios em estado de plasmólise, grandes espaços vazios produzidos por prévio vazamento do citoplasma e lise de organelas membranosas, a parede celular aparece mais delgada (Figura 3E) e material eletrodense (Figuras 3D e 3E).

O óleo essencial de *E. caryophyllata* provocou vacuolização, fusão de vacúolos e condensação do citoplasma, e disrupção da estrutura interna das mitocôndrias, com diminuição das cristas (Figuras 3F e 3G). Houve também vazamento do citoplasma e compostos eletrodensos cobrindo partes do citoplasma agregado (Figuras 3F e 3G).

Os conídios expostos ao óleo essencial de *C. martini* apresentaram espaços vazios (Figura 3H), um grande vacúolo, retração, ondulação e invaginação do plasmalema (Figura 3I), condensação citoplasmática, agregados eletrodensos e vesículas (Figuras 3H e 3I).

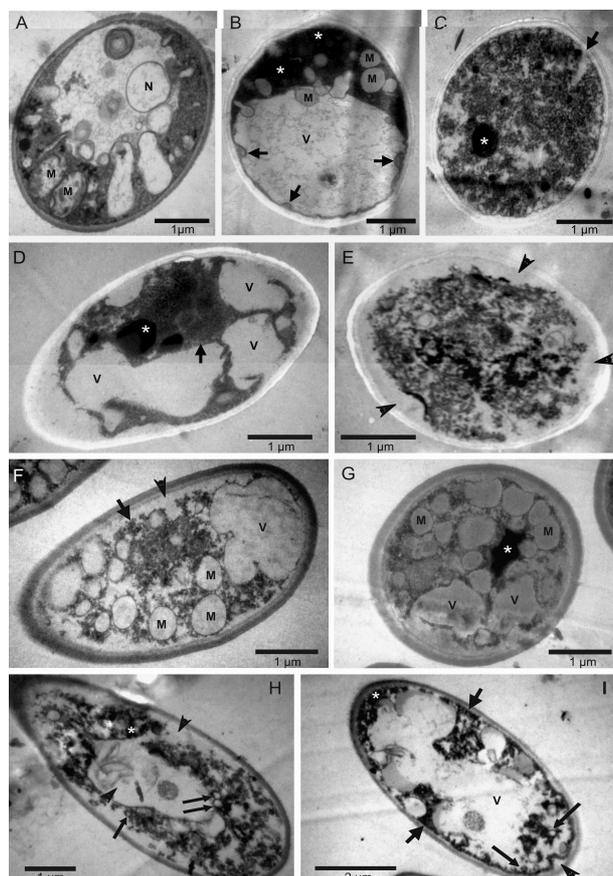


Fig. 3. Efeito de óleos essenciais (OE) a 0,1% sobre a ultraestrutura de conídios da raça 65 de *C. lindemuthianum*. **A**, controle, mitocôndria (M), núcleo (N). **B e C**, tratamento com fungicida. **B**, observa-se mitocôndrias (M), um grande vacúolo (V), invaginação do plasmalema (setas) e material eletrodense (asteriscos). **C**, conídio degradado, com plasmalema quebrado (seta) e material eletrodense (asterisco). **D e E**, tratamento com OE de *C. citratus*. **D**, nota-se vacuolização (V), condensação do citoplasma (seta) e material eletrodense (asterisco). **E**, conídio degenerado, com espaços vazios (pontas de setas), em estado de plasmólise e **F e G**, tratamento com OE de *E. caryophyllata*. **F**, observa-se condensação do citoplasma (seta), espaço vazio (ponta de seta), vacúolo (V) e mitocôndrias (M). **G**, mitocôndrias (M), vacúolos (V) e material eletrodense (asterisco) são vistos. **H e I**, tratamento com OE de *C. martini*. **H**, são observadas vesículas (setas), espaços vazios (pontas de setas). **I**, nota-se a ondulação e invaginação

do plasmalema (ponta de seta), vesículas (setas delgadas), vacúolo (V), material eletrodenso (asterisco) e citoplasma disperso misturado a espaço vazio (setas maiores).

É importante ressaltar que a maioria destes danos é irreversível e que as mudanças ultraestruturais, tais como desorganização e vazamento do citoplasma, podem ser provocadas pela perda da integridade nas membranas, o que pode levar à morte celular. A complexa composição dos óleos essenciais sugere múltiplos mecanismos de ação e diversos alvos de invasão. De acordo com Carson et al. (2002) e Bakkali et al. (2008), o modo de ação dos óleos essenciais afeta, geralmente, vários alvos ao mesmo tempo e não tem sido descritas resistência ou adaptação a estes óleos.

Segundo Denyer (1990), o vazamento de material intracelular é, em geral, provocado por muitas substâncias antimicrobianas. Morte celular pode ocorrer pela grande perda do conteúdo celular, saída de moléculas e íons importantes e o início de autólise. Além disso, a permeabilização de membranas mitocondriais externas e internas leva à morte celular por apoptose e necrose (Armstrong, 2006). É possível que reações em cadeia da parede ou da membrana celular exterior invadam a célula inteira, através das membranas de diferentes organelas, tais como mitocôndrias e peroxissomas (Bakkali et al., 2008).

Neste trabalho, a permeabilidade de membranas foi confirmada por TEM e pela alta inibição da germinação nos conídios tratados com óleos essenciais. Uma membrana plasmática descontínua e ondulada e a degeneração da estrutura mitocondrial interna, com diminuição nas cristas, indicam membranas severamente alteradas nos conídios de *C. lindemuthianum* expostos aos óleos essenciais.

De acordo com estudos de permeabilidade da membrana (Sikkema et al., 1995; Vercesi et al., 1997), alguns compostos de óleos essenciais, como lipófilos típicos, passam através da parede e membrana citoplasmática, afetando a

estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos, permeabilizando-as. A citotoxicidade parece incluir esses danos na membrana. Em eucariotos, estes óleos promovem despolarização das membranas mitocondriais por diminuição do potencial de membrana, afetando o ciclo iônico de Ca^{2+} . Ultee et al. (2002) relataram que a distorção da estrutura física celular causaria expansão e desestabilização da membrana, o que aumentaria a sua fluidez e a permeabilidade passiva.

As mudanças ultraestruturais reportadas neste estudo encontram suporte em várias pesquisas realizadas em diferentes patossistemas, por Avis et al. (2009); Rozwalka et al. (2010); Dan et al. (2010) e Hoyos et al. (2012).

Os óleos essenciais de plantas são eficazes contra patógenos fúngicos e bacterianos. Além disso, seus compostos são biodegradáveis, têm baixa toxicidade em mamíferos, o que os torna de grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado de doenças de plantas (Isman & Machial, 2006; Riefler et al., 2009; Dubey et al., 2010).

3.4. Composição química dos óleos essenciais

A identificação e a composição dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser observadas na Tabela 2, dos quais se destacam cinamaldeído (92,36%), em *Cinnamomum* sp.; eugenol (91,94%), em *E. caryophyllata*; geraniol (75,92%), em *C. martini*; pulegone (68,96%), em *C. verbenaceae*; geranial (58,89%), seguido de neral (38,50%), em *C. citratus*; timol (33,72%), em *T. vulgaris* e β -farnesene (31,17%), em *M. recutita*.

A atividade citotóxica dos óleos essenciais, em geral, deve-se, principalmente, à presença de fenóis, aldeídos e alcoóis (Sacchetti et al., 2005). Esse aspecto foi corroborado no presente estudo ao identificarem-se os maiores

componentes dos três óleos essenciais que apresentaram maior inibição da germinação, que foram geranial e neral (aldeídos), em *C. citratus*; eugenol (fenol), em *E. caryophyllata* e geraniol (álcool), em *C. martini*. Na literatura, somente os principais componentes de alguns outros óleos essenciais, incluindo eugenol, timol, carvacrol, cinamaldeído, entre outros, têm sido estudados. Os principais constituintes dos óleos essenciais estudados aqui poderiam ter um forte efeito antimicrobiano (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008), o qual pode indicar que estas moléculas têm sinergismo na sua atividade antimicrobiana. Os efeitos sinérgicos dos diversos constituintes maiores e menores dos óleos essenciais poderiam ser tomados em consideração pela sua atividade antimicrobiana.

3.5. Óleos essenciais no controle da antracnose do feijoeiro

3.5.1. Experimento preventivo

Avaliando-se o efeito protetor das plantas de feijoeiro contra a antracnose, observou-se que os tratamentos ASM, fungicida e óleo essencial de *C. citratus* mostraram menor severidade da doença em relação à testemunha (água). O ASM promoveu a maior redução da antracnose, em até 62%, seguido pelo fungicida e pelo óleo de *C. citratus*, com redução de 44% e 29%, respectivamente. Estes dois últimos tratamentos não diferiram entre si, mas diferiram do ASM e da testemunha. Os demais tratamentos não reduziram significativamente a doença, não diferindo da testemunha (Tabela 3).

3.5.2. Experimento curativo

Todos os tratamentos demonstraram efeito curativo, pois reduziram a severidade da antracnose do feijoeiro em relação à testemunha, sem divergir

entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). O fungicida apresentou a mais alta redução da antracnose (28,5%), seguido dos óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini*, em 21, 18,7 e 13,5%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3

Área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) e porcentagem de controle da antracnose em função dos tratamentos, nos experimentos preventivo e curativo em feijoeiro, em casa de vegetação.

Tratamentos	Experimento		Experimento curativo	
	AACPSD	Controle	AACPSD	Controle
Água	127 ^c	-	118 ^b	-
<i>C. martini</i>	124 ^c	2	102 ^a	13,5
<i>E. caryophyllata</i>	103 ^c	19	96 ^a	18,7
<i>C. citratus</i>	89 ^b	29	93 ^a	21
Fungicida	71 ^b	44	85 ^a	28,5
Acibenzolar-S-metil	48 ^a	62	-	-
C.V. (%)	21,21	-	9,34	-

Médias com mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os óleos essenciais utilizados nestes experimentos, na concentração de 0,1%, não produziram sintomas de fitotoxidez nas plantas de feijoeiro. No ensaio preventivo, observou-se que os óleos essenciais poderiam estar ativando mecanismos de autodefesa nas plantas de feijoeiro, visto que diversos constituintes antimicrobianos destes óleos se volatilizam rapidamente ou não têm uma prolongada permanência nos tecidos tratados (Isman & Machial, 2006; Edris, 2007; Bakkali et al., 2008). Por isso, não seria possível que os óleos essenciais, após sete dias de pulverizados, tivessem um efeito antimicrobiano direto sobre *C. lindemuthianum*, inoculado sete dias depois da aplicação dos óleos e, sim, um efeito de tipo indução de resistência nas plantas.

Para o tratamento com *C. citratus*, tanto no experimento preventivo como no curativo, ocorreu redução da severidade da antracnose do feijoeiro, apresentando redução da doença em 29% e 21%, respectivamente, além de não diferir estatisticamente do tratamento com fungicida, que reduziu a doença em 44% e 28,5%, nos dois experimentos, respectivamente (Tabela 3). Diante disso, comprovou-se a efetividade do óleo de *C. citratus* para diminuir a antracnose, de forma direta, como demonstrado no experimento curativo e pela alta citotoxicidade sobre conídios de *C. lindemuthianum* (Fig. 3D e 3E) e, de forma indireta, pela possível ação indutora de mecanismos de defesa na planta, como observado no experimento preventivo.

Neste estudo foram obtidos resultados semelhantes aos registrados em outros trabalhos, em diversos patossistemas. Em trabalhos utilizando óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja em casa de vegetação, Medice et al. (2007) obtiveram redução da severidade em 35% e 62%, em duas cultivares tratadas sete dias antes da inoculação (tratamento preventivo). Pereira et al. (2008) observaram redução em 16% do número de lesões da cercosporiose do cafeeiro pela aplicação de óleo essencial de tomilho, sete dias antes da inoculação (tratamento preventivo).

3.6. Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na atividade das enzimas de defesa

Aos três dias após a pulverização (DAP), ainda sem inoculação com *C. lindemuthianum*, observou-se que a atividade de quitinases (QUI) foi maior no tratamento com ASM. O tratamento com óleo essencial de *C. citratus* (Cc) e a testemunha (Te) não diferiram entre si, mas divergiram com relação a ASM (Figura 4A). Depois de as plantas serem inoculadas (logo após a primeira coleta), observou-se, aos 4 DAP, em todos os tratamentos, atividade semelhante de QUI. Aos 5 DAP, os tratamentos ASM e Cc inoculado apresentaram igual

atividade de QUI, diferindo dos demais tratamentos (Figura 4A). Em feijoeiro, Campos et al. (2009) observaram maiores atividades de quitinases em quatro cultivares, três dias após a inoculação de *C. lindemuthianum* avirulento.

A atividade da polifenoloxidase (PFO) aos 3 DAP foi semelhante estatisticamente para todos os tratamentos. Aos 4 DAP, a atividade da PFO foi maior em plantas tratadas com ASM sem inoculação com *C. lindemuthianum*. Já aos 5 DAP, época da última avaliação, que corresponde a dois dias após a inoculação, observou-se que o tratamento com o ASM inoculado com *C. lindemuthianum* apresentou maior atividade, seguido do tratamento com o óleo essencial de *C. citratus* também inoculado, diferindo dos demais tratamentos (Fig. 4B).

Após esse período, possivelmente, poderia haver um aumento na atividade dessa enzima, pelo reconhecimento do patógeno pela planta. Em tomateiro, Itako et al. (2008) reportaram aumento na atividade da PFO em folhas tratadas com óleo essencial de *C. citratus* e inoculadas com *Alternaria solani*. Ademais, o incremento na atividade desta enzima provoca grande concentração de produtos tóxicos de oxidação e, portanto, maior nível de resistência aos patógenos (Zheng-Cuiming et al., 1999).

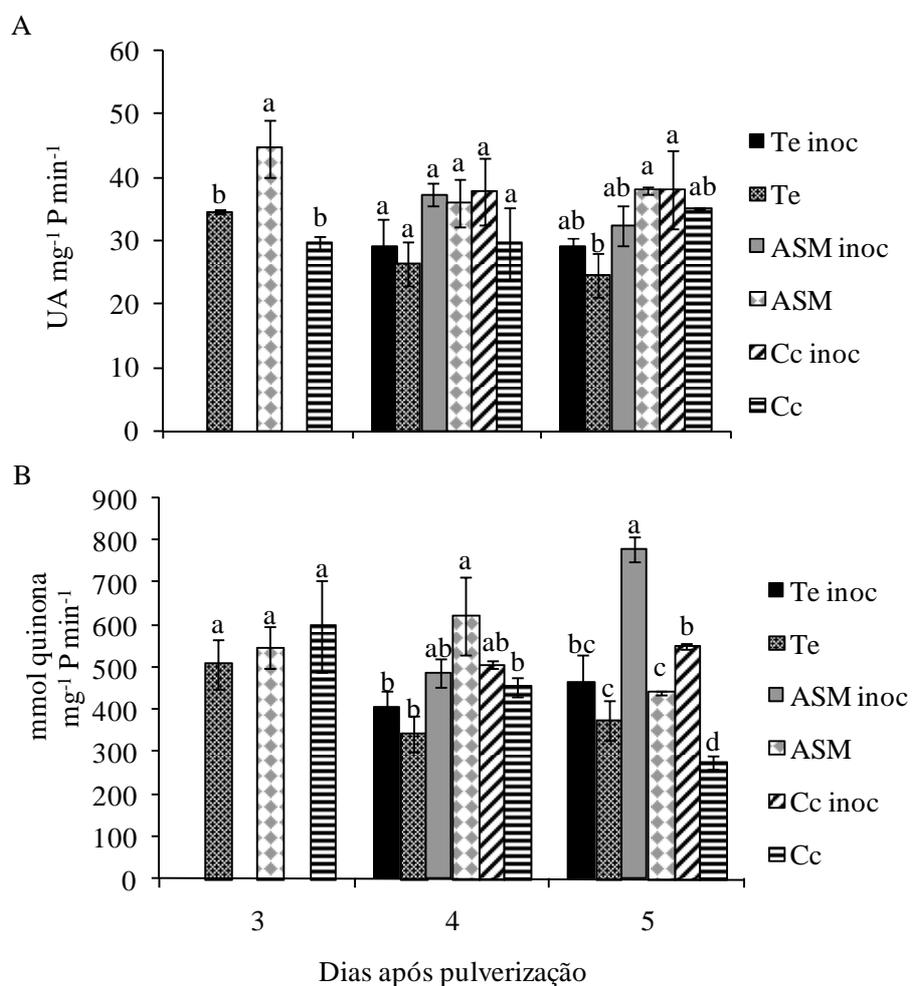


Fig. 4. Atividade quitinases (QUI) (A) e polifenoloxidasas (PFO) (B) em folhas de feijoeiro cv. Pérola, após pulverização com água (Te), água e inoculado com *C. lindemuthianum* (Te inoc), acibenzolar S-metil (ASM), acibenzolar-S-metil inoculado com *C. lindemuthianum* (ASM inoc), *C. citratus* (Cc) e *C. citratus* inoculado com *C. lindemuthianum* (Cc inoc). A inoculação com *C. lindemuthianum* ocorreu aos 3 dias após a pulverização. Barras com mesma letra não diferem, pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão.

A atividade da peroxidase (POX) manteve-se semelhante em todos os tratamentos aos 3 e aos 4 DAP. Aos 5 DAP, a atividade desta enzima teve um grande incremento em plantas tratadas com ASM e inoculadas com *C. lindemuthianum*, diferindo dos demais tratamentos (Figura 5A). Itako et al. (2008), utilizando óleo essencial de *C. citratus*, constataram aumento significativo, tanto local como sistêmica, na atividade da peroxidase e da polifenoxidase, com máxima resposta para ambas, aos dois dias após a inoculação com *Alternaria solani*, em tomateiro. Em outro estudo, Pereira et al. (2008) observaram que o ASM e o óleo essencial de tomilho elevaram a atividade da peroxidase em folhas de cafeeiro, aos 2 e aos 9 dias após a pulverização. Como é conhecido, as plantas pré-condicionadas respondem mais rapidamente e ou de forma eficaz, quando re-expostas ao estresses biótico ou abiótico (Goellner & Conrath, 2008).

Para a atividade de fenilalanina amônia liase (FAL), dos 3 aos 5 DAP, não foi observado efeito significativo dos tratamentos para plantas inoculadas nem para as não inoculadas (Figura 5B). Mozzetti et al. (1995) também não reportaram diferenças nas atividades da FAL em folhas de pimenta inoculadas ou não com *Phytophthora capsici* e *P. parasitica*. Porém, em pesquisas com indutores bióticos e abióticos em *Phaseolus vulgaris* e *Musa* spp., mostraram atividade tardia da FAL, aos 6, 8 e 12 dias após os tratamentos (Campos et al., 2003; Saravanan et al., 2004). Em estudos futuros poderiam ser incluídos tempos de coleta aos 10 e/ou 12 dias, devido à possível atividade tardia desta enzima.

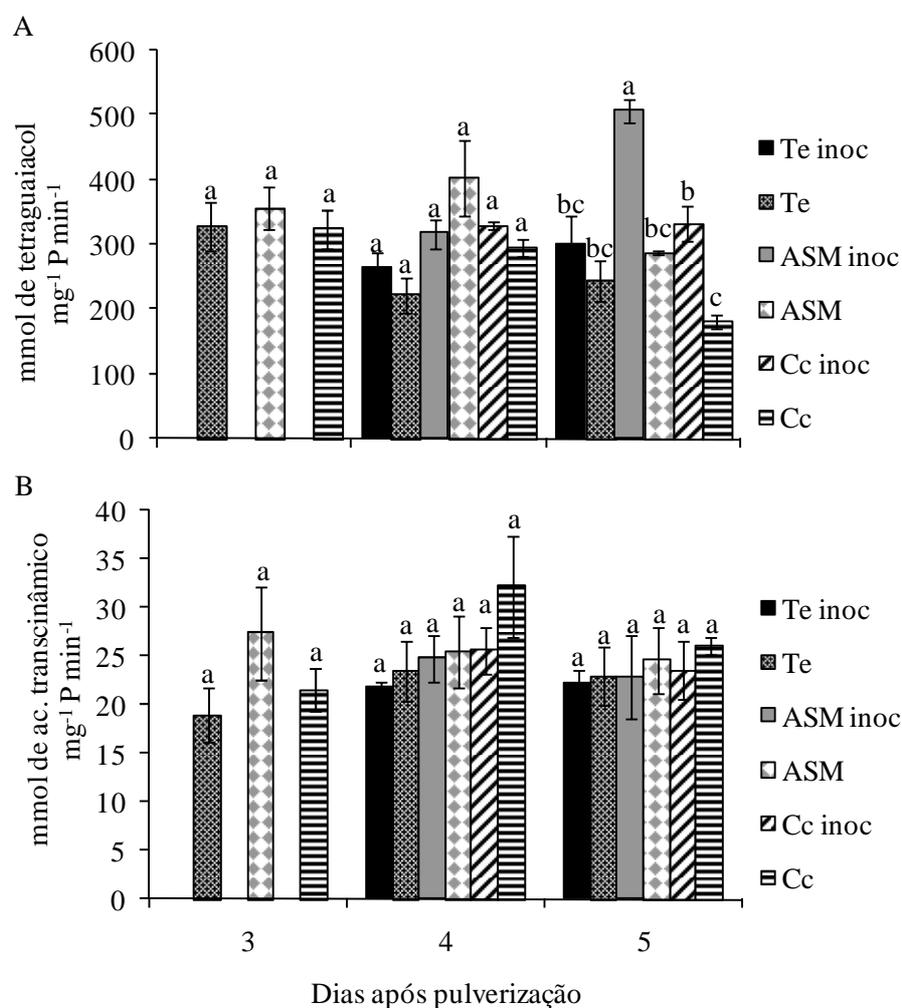


Fig. 5. Atividade de peroxidases (POX) (A) e fenilalanina amônia liase (FAL) (B) em folhas de feijoeiro cv. Pérola, após pulverização com água (Te), água e inoculada com *Colletotrichum lindemuthianum* (Te inoc), acibenzolar S-metil (ASM), acibenzolar S-metil inoculado com *C. lindemuthianum* (ASM inoc), *C. citratus* (Cc) e *C. citratus* inoculado com *C. lindemuthianum* (Cc inoc). A inoculação com *C. lindemuthianum* ocorreu aos três dias após a pulverização. Barras com mesma letra não diferem, pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão.

Por outro lado, segundo Walling (2001), os voláteis são potentes sinalizadores para induzir resistência, mas precisam ser cuidadosamente avaliados. Como é sabido, muitos dos constituintes dos óleos essenciais são voláteis e sua ação antimicrobiana já tem sido comprovada (Daferera et al., 2003; Soyly et al., 2006; Lee et al., 2007). A hipótese, de acordo com Almeida et al. (2012), é que, as menores atividades das enzimas após a pulverização das plantas podem estar relacionadas à sinalização desencadeada por compostos voláteis. Esses voláteis são descritos como sinais de defesa reconhecidos por receptores de membranas que respondem por meio de amplificação de sinais. Tais mecanismos de amplificação de respostas em geral requerem baixas concentrações proteicas e podem gerar respostas mais efetivas e menos transitórias do que a síntese de enzimas de indução de resistência.

Os óleos essenciais podem ser uma boa alternativa de controle da antracnose do feijoeiro, pois, além de apresentarem toxidez direta ao fungo, podem também atuar induzindo respostas de defesa nas plantas. Além disso, os óleos apresentam baixa toxicidade em mamíferos, são biodegradáveis, eficazes contra os tipos selvagens e as raças resistentes aos pesticidas, devido à complexa mistura de componentes, e são economicamente viáveis.

Conclusões

O potencial fungitóxico está relacionado à composição química do óleo essencial, assim como à sensibilidade do patógeno a um ou mais constituintes em diferentes quantidades.

A ação fungitóxica direta dos óleos essenciais de *C. citratus*, *E. caryophyllata* e *C. martini* causa danos severos à ultraestrutura de conídios de *C. lindemuthianum*, invalidando a germinação.

O óleo essencial de *C. citratus* evidenciou indução de enzimas de defesa.

Os resultados demonstram que estes compostos são viáveis como potencial método alternativo de controle de doenças e podem ser incorporados no manejo integrado da antracnose do feijoeiro, representando menos risco para a saúde humana e o ambiente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a bolsa de doutorado concedida; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade para o segundo autor e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, Brasil.

Referências

- Abud, R.O.G., Wendland, A., Pereira, R.J., Melo, L.C., Pereira, H.S., da Costa, J.G.C. 2011. Frequência de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* nos estados brasileiros produtores de feijoeiro comum. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 6., 2011, Búzios. Panorama atual e perspectivas do melhoramento de plantas no Brasil. [Búzios]: SBMP, 2011.
- Almeida, H.O., Barbosa, M.O., Marques, A.E., et al., 2012. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem asiática da soja. *Pesq. Agropec. Bras.* 47(2), 163-172.

- Armstrong, J.S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253-260.
- Avis, T.J., Rioux, D., Simard, M., Michaud, M., Tweddell, R.J., 2009. Ultrastructural Alterations in *Fusarium sambucinum* and *Heterobasidion annosum* Treated with Aluminum Chloride and Sodium Metabisulfite. *Phytopathology* 99(2), 167-175.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Balardin, RS & Kelly, JD., 1997. Re-characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* races. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 40, 126-127.
- Bång, U., 2007. Screening of natural plant volatiles to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogens *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. *Potato Res.* 50, 185-203.
- Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S., Flores-Moctezuma, H.E., Rojas-Estudillo, A., 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathol.* 7, 174-178.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1/2), 248-254.
- Brent, K.J. & Hollomon, D.W., 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC, Global Crop Protection Federation, Brussels, Monograph 2, 1-48.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Campos, A.D., Ferreira, A.G., Hampe, M.M.V., Antunes, I.F., Brancão, N., Silveira, E.P., Silva, J.B., Osorio, V.A., 2003. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Braz. J. Plant Physiol.* 15, 129-134.
- Campos, A.D., Hampe, M.M.V., Ferreira, A.G., Antunes, I.F., Castro, L.A.S., 2009. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-

- comumpela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. Pesq. Agropec. Bras. 44(1), 15-21.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1914–1920.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, G.M., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Prot. 22, 39–44.
- Dan, Y., Liu, H., Gao, W., Chen, S., 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. Crop Prot. 29, 295–299.
- Denyer, S.P., 1990. Mechanisms of action of biocides. Int. Biodeterior. Biodegrad. 26, 89-100.
- Dubey, N.K., Kumar, A., Singh, P., Shukla, R., 2010. Exploitation of Natural Compounds in Eco-Friendly Management of Plant Pests. In: Gisi, U., Chet, I., Gullino, M.L. (Eds). Recent Developments in Management of Plant Diseases. Springer, 1(3), pp. 181-198.
- Edris, EA., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. Phytother. Res. 21, 308–323.
- Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Vida, J.B., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S., Pascholati, S.F., 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. J. Phytopathol. 148, 483-487.
- Gauillard, F., Forget, F. R., Nicolas, J., 1993. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. Anal. Biochem. 215(1), 59-65.
- Goellner, K. & Conrath, U., 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. Eur. J. Plant Pathol. 121(3), 233-242.
- Godoy, C.V., Carneiro, S.M.T.P.G., Iamauti, M.T., Pria, M.D., Amorim, L., Berger, D., Bergamin Filho, A., 1997. Diagrammatic scales for bean

- diseases: development and validation. *J. Plant Dis. Protect.* 104(4), 336-345.
- Hammerschmidt, R. & Kuc, J., 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 20(1), 61-71.
- Hoyos, J.M.Á., Alves, E., Rozwalka, L.C., Souza, E.A., Zeviani, W.M., 2012. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciênc. Agrotec.* 36(3), 270-284.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603- 608.
- Isman, M.B. & Machial, C.M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Rai & Carpinella (eds.). *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, 2006. Elsevier. Chapter 2. pp.29-44.
- Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolin, L., Romeiro, R.S., Gasparotto, R. 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. *Rev. Ceres* 31, 322-331.
- Itako, A.T., Tolentino Junior, J.B., Schwan-Strada, K.R.F., Balbi-Peña, M.I., 2008. Polifenoloxidase induzida por óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em folhas de tomateiro inoculadas com *Alternaria solani*. *Summa Phytopathol.* 34 (Supl.):54.
- Karban, R., Kuc, J., 2000. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. In: Agrawal, A.A., Tuzun, S., Bent, E. (Eds.). *Induced Plant Defense Against Pathogens and Herbivores—Biochemistry, Ecology and Agriculture*. St. Paul: APS Press, pp. 1-16.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I., 2011. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytotherapy* 19(1), 48-55.
- Leadbeater, A. & Staub, T., 2007. Exploitation of induced resistance: a commercial perspective. In: Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. (Eds.). *Induced resistance for plant defence: A sustainable approach to crop protection*. Blackwell, Chap. 12, p. 229-241.

- Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C., 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 23, 97-102.
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2(2), 176-177.
- Medice, R., Alves, E., Assis, R.T., Júnior, M.R.G., Lopes, E.A.G.L., 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciênc. Agrotecnol.* 31(1), 83-9.
- Mori, T., Sakurai, M., Sakuta, M., 2001. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Sci.* 160, 355-360.
- Mozzetti, C., Ferraris, L., Tamietti, G., Matta, A., 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*–pepper interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 95–107.
- Pereira, B.R., Alves, E., Júnior, P.M.R., Resende, M.L.V., Lucas, G.C., Ferreira, J.B., 2008. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 43(10), 1287-1296.
- Pinto, J.M.A., Pereira, R., Mota, S.F., Ishikawa, F.H., Souza, E.A., 2012. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. *Phytopathology* 102(5), 490-497.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control.* 17, 359-364.
- Ribeiro, F.E., Peloso, M.J., Barbosa, F.R., Gonzaga, A.C.O., Oliveira, L.F.C., 2011. Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. EMBRAPA, Circular Técnica 89, p.64.
- Riefler, J.; Novak, J; Koschier, E.H., 2009. Components of essential oils in plant protection. *Z. Arznei- Gewurzpflanzen* 14(2), 70-76.

- Rozwalka, L.C., Alves, E., Amaral, D.C., 2010. Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. *Interciencia* 35, 912-915.
- Saravanan, T., Bhaskaran, R., Muthusamy, M., 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* 3:72-80.
- Schwan-Estrada, K.R.F., 2003. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência - plantas medicinais. *Summa Phytopathol.* 29, 124-125.
- Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., 2005. Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V., Romeiro, R.S. (Ed.). Piracicaba: FEALQ, pp. 125- 138.
- Shaner, G., Finney, R.F., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67(8), 1051-1056.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Singh, G., Singh, O.P., Rao, G.P., Sharma, S.R., 2002. The vapour action of essential oils and monoterpenoids against pathogenic fungi. *Sugar Tech.* 4, 69-71.
- Soylu, E.M., Soyly, S., Kurt, S., 2006. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119–128.
- Talamini, V., Souza, E. A., Pozza E. A., Carrijo, F. R. F., Ishikawa, F. H., Silva, K. J. D., and Oliveira, F. A. 2004. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. *Summa Phytopathol.* 30, 371-375.
- Ultee, A., Bennik, M. H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561-1568.

- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarska, E., Herka, H., 1991. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiol. Plant.* 13(1), 43-50.
- Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 17, 43-52.
- Viecelli, C.A., Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Schwan-Estrada, K.R.F., 2010. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. *Summa Phytopathol.* 36(1), 73-80.
- Vieira, C., Paula Júnior, T.J. de., Borém, A. 2006., Feijão. 2. ed. Viçosa: UFV, p.600.
- Walling L.L., 2001. Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends Plant Sci.* 6(10), 445-447.
- Wirth, S.J. & Wolf, G.A., 1990. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J. Microbiol. Methods.* 12(3/4), 197-205.
- Zheng-Cuiming, Teng-Bing, Gao-Fengi, Wuzongpu, Zheng-C.M., Teng-B., Gao-F.L., Wu-Z.P., 1999. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and poliphenol oxidase in seed coat of soybeans after infection with soybean mosaic virus. *Sci. Agricult. Sinica* 32, 99-101.