



**ANDRÉ COSTA DA SILVA**

**CONTROLE DE OÍDIO EM EUCALIPTO E DA  
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA POR  
EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
PLANTAS**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**ANDRÉ COSTA DA SILVA**

**CONTROLE DE OÍDIO EM EUCALIPTO E DA FERRUGEM  
ASIÁTICA DA SOJA POR EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
PLANTAS**

Dissertação 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. Paulo Estevão de Souza

Coorientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS - MG**

**2011**

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

Silva, André Costa da.

Controle de oídio em eucalipto e da ferrugem asiática da soja por  
extratos e óleos essenciais de plantas / André Costa da Silva. –  
Lavras: UFLA, 2011.

113 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. *Phakopsora pachyrhizi*. 3. *Oidium eucalypti*. 4.  
*Eucalyptus* ssp. 5. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

**ANDRÉ COSTA DA SILVA**

**CONTROLE DE OÍDIO EM EUCALIPTO E DA FERRUGEM  
ASIÁTICA DA SOJA POR EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
PLANTAS**

Dissertação 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 30 de setembro de 2011.

Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Ph.D Acelino Couto Alfenas	UFV.
Dra. Maria Alves Ferreira.	UFLA.

Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende  
Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por guiar o meu caminho, por minha saúde e pela força de vontade para correr atrás dos meus ideais.

Aos meus pais que me ensinaram que trabalho duro e perseverança são ferramentas ideais para atingir nossas metas.

Aos meus irmãos, pelo carinho e incentivo.

Aos grandes amigos que fiz em Lavras.

À Universidade Federal de Lavras/Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização desse trabalho.

Aos Professores Dr. Paulo Estevão de Souza e Ph.D Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, disponibilidade e incentivos durante o doutorado.

Ao Professor Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo apoio, disponibilização do laboratório e equipamentos.

A todos do Departamento de Fitopatologia, funcionários, professores, técnicos administrativos, mestrados e doutorandos.

Aos amigos do laboratório de fisiologia do parasitismo que me ajudaram na execução desse trabalho, Pedro, Natália, Bruno, Manoel, Gabriel, Rodolfo, Marcelo, Vinícius e Camila.

Enfim, a todos aqueles que torceram por mim e de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho, um muito obrigado!

## RESUMO

A ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e o oídio (*Oidium eucalypti*) estão entre as principais doenças da cultura da soja e do eucalipto respectivamente. A ferrugem asiática necessita de formas de controle alternativas a fim de minimizar os prejuízos causados após a sua ocorrência nas plantações de soja. O oídio ocorre em minijardins clonais cobertos e em casa de vegetação na ausência predominante de molhamento foliar e não há fungicidas registrados no Brasil para o seu controle. Assim sendo, este trabalho teve como objetivos buscar novas alternativas para o controle da ferrugem asiática da soja e do oídio do eucalipto. Para o controle da ferrugem asiática, foi avaliada a capacidade curativa e erradicante dos óleos essenciais de *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea*. Para o oídio do eucalipto, foi determinada a capacidade de controle local e sistêmico dos óleos essenciais e decoctos dessas mesmas três espécies de plantas medicinais. Em outro trabalho, foram testados o extrato vegetal NEFID, diferentes formulações de fosfitos e a combinação entre eles no controle do oídio e na produção e porcentagem de enraizamento de miniestacas de eucalipto. Os dados obtidos nestes trabalhos mostraram que os óleos das três espécies de plantas inibiram 100% da germinação dos urediníóporos da *Phakopsora pachyrhizi*, causaram modificações na sua morfologia e foram eficientes no controle da ferrugem da soja de forma curativa, mas não tiveram efeito erradicante. Os óleos essenciais e decoctos das três espécies de plantas medicinais apresentaram um controle local e sistêmico do oídio e causaram também modificações na sua morfologia. Em relação aos fosfitos e ao extrato NEFID, verificou-se que o extrato e os fosfitos de cobre, zinco e de potássio/manganês foram eficientes no controle do oídio. No entanto, fosfito de potássio, não. Entre as misturas, a que continha 50% do extrato vegetal NEFID com 50% de fosfito de cobre foi a mais eficaz, por apresentar toxicidade direta sobre o oídio, alta eficiência curativa, ação antiesporulante e por não interferir negativamente na produção de brotos e no enraizamento das miniestacas de eucalipto.

Palavras-chave: Controle alternativo de doença de planta. Microscopia eletrônica de varredura. *Glycine Max*. *Phakopsora pachyrhizi*. *Oidium eucalypti*. Eucalipto. Indução de resistência.

## ABSTRACT

Asian Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and Powdery Mildew (*Oidium eucalypti*) are two of the major diseases of the soybean and of the eucalypt crops. Asian Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is one of the most aggressive and destructive diseases that affect soybean crops, requiring alternative control methods in order to minimize crop damage. The powdery mildew (*Oidium eucalypti*) pathogen occurs in the greenhouse and covered clonal mini gardens predominantly in the absence of leaf wetting. In Brazil, there are no fungicides registered for control of powdery mildew. Thus, the objective of this study was to seek new alternative control methods for the soybean rust and for the powdery mildew. For the control of soybean rust, we assessed the curative and eradicated abilities of essential oils from *Hyptis marruboides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* medicinal plants. For the powdery mildew, we evaluated the ability of local and systemic control through essential oils and decoctions of the same three species of medicinal plants used for the assessment of soybean rust control. In a separated study, we tested the plant extract NEFID, different phosphites formulations and the combination of both in the control of the powdery mildew as well as the production and rooting percentage of eucalyptus mini-cuttings. The data obtained in this work showed that the oils from the three plant species inhibited 100% of urediniospores germination of *P. pachyrhizi*, changed their morphology, and provided effective control of the soybean rust with curative activity, but they have had no effect on its eradication. Essential oils and decoctions from the three species of medicinal plants showed a local and systemic control of the powdery mildew while also changing their morphology. With regard to the NEFID extract and the phosphites, we verified that, the extract and the phosphites of copper, of zinc, of potassium and of manganese were effective in controlling powdery mildew, whereas potassium phosphite was not. Among the mixtures, the most effective was the one containing 50% of the plant extract NEFID with 50% copper phosphite for its direct fungi-toxicity against pathogen *Oidium eucalypti*, high curative activity, and anti-sporulating action and for not having an adverse effect on the production of shoots and on roots of the eucalyptus mini-cuttings.

Keywords: Alternative control of plant disease. Scanning electron microscopy. *Glycine max.* *Phakopsora pachyrhizi.* *Oidium eucalypti.* Eucalyptus. Induction of resistance.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	8
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	8
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
<b>2.1</b>	<b>A cultura da soja e a ferrugem asiática</b> .....	10
<b>2.2</b>	<b>Cultura do Eucalipto</b> .....	12
<b>2.3</b>	<b>Oídio do eucalipto</b> .....	14
<b>2.4</b>	<b>Fosfitos no controle de doenças de plantas</b> .....	15
<b>2.5</b>	<b>Óleos essenciais, extrato vegetal e decocto no controle de fitopatógenos</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>Plantas medicinais de <i>Aloysia gratissima</i>, <i>Cordia verbenacea</i> e <i>Hyptis marrubioides</i></b> .....	21
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	37
	<b>ARTIGO 1 Essential oils from <i>Hyptis marrubioides</i>, <i>Aloysia gratissima</i> and <i>Cordia verbenacea</i> inhibit the progress of Asian soybean rust</b> .....	37
	<b>ARTIGO 2 Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants</b> .....	60
	<b>ARTIGO 3 Extrato de folha de cafeeiro e fosfitos no controle do oídio em minicepas de eucalipto</b> .....	86



## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja e o eucalipto representam duas culturas de grande importância para o agronegócio brasileiro. Atualmente, para os produtores de soja e eucalipto, a ferrugem asiática da soja e o oídio do eucalipto são as principais doenças dessas culturas e estão entre os principais problemas limitantes de seu rendimento. Desde as primeiras epidemias severas até a safra de 2007/08, o custo da ferrugem asiática no Brasil foi estimado em aproximadamente US\$ 10,1 bilhões, incluindo as perdas em produção, arrecadação e o custo com o controle dessa doença (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2011). No caso do oídio do eucalipto, não existem estudos completos para estimar os prejuízos causados (AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS, 1999), mas já se sabe que ele pode causar perdas significantes quando não controlado (BROWN; FERREIRA, 2000) e embora raramente cause a morte das plantas, o oídio reduz o potencial produtivo da cultura e pode afetar a qualidade do produto final (STADNIK; RIVERA, 2001).

O oídio do eucalipto, cujo agente etiológico é *Oidium eucalypti* ocorre principalmente em minijardins clonais cobertos e em casas de vegetação na ausência de molhamento foliar. Para que as mudas de eucalipto possam ser comercializadas e expressar o seu potencial genético, é necessário que estejam em perfeitas condições fitossanitárias. Sendo assim, o controle do oídio nesses dois ambientes onde o fungo ocorre em maior frequência torna-se necessário.

Atualmente, há uma busca por produtos eficientes no controle de doenças, apresentem compostos na sua constituição que não causem danos ao meio ambiente e à saúde dos trabalhadores, além de auxiliarem na produção de alimentos de alta qualidade, sem resíduos tóxicos.

Estudos relacionados a métodos alternativos de controle da ferrugem asiática e do oídio do eucalipto ainda são escassos. Deste modo, objetivou-se neste trabalho encontrar novas alternativas de baixa toxicidade ao homem e ao meio ambiente para serem utilizadas nos controles do oídio do eucalipto e da ferrugem asiática da soja de forma sustentável.

A tese encontra-se dividida em quatro capítulos. No capítulo 1, trata-se de um referencial teórico que aborda as questões sobre a cultura da soja e ferrugem asiática, a cultura do eucalipto, oídio do eucalipto, fosfitos no controle de doenças de plantas, óleos essenciais, extrato vegetal e decocto no controle de fitopatógenos e sobre as plantas medicinais de *Hyptis marruboides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea*. No segundo capítulo, trata dos óleos essenciais de *Hyptis marruboides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea* que inibem o processo da ferrugem asiática da soja. O terceiro capítulo aborda o controle local e sistêmico do oídio em mudas de eucalipto tratadas com óleos essenciais e decoctos de plantas medicinais. O quarto e último capítulo diz respeito ao extrato de folha de cafeeiro e aos fosfitos no controle do oídio em minicepas de eucalipto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura da soja e a ferrugem asiática

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill é originária da Ásia, mais precisamente da China, sendo considerada uma das plantas cultivadas mais antigas do mundo (HYMOWITZ, 1970).

A primeira referência sobre o cultivo da soja no Brasil foi em 1882 na Bahia (BONETTI, 1981). Em 1970, devido ao aumento da área plantada e a avanços científicos, a cultura da soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2004). Hoje vem ocupando uma posição de crescente destaque e expansão no Brasil. É cultivada em praticamente todo território nacional (CÂMARA, 1998), sendo, atualmente, uma das principais culturas de exportação.

Em 2010/11, a previsão de área plantada com soja no Brasil indica um crescimento entre 1,1% e 3,1%, o que corresponde a uma área entre 23,74 e 24,20 milhões de hectares. Em 2009/10, foram cultivados 23,47 milhões de hectares, um recorde até então. Dessa forma, pode-se estimar uma produção entre 67,69 e 69,0 milhões de toneladas e um crescimento de 0,5%. Para a safra 2010/11, os preços médios em dólar recebidos pelos produtores no estado do Mato Grosso estão cerca de 30% acima dos praticados na safra 2009/10 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

Entre os fatores que limitam a produção da soja, estão as doenças. Mais de 40 doenças causadas por vírus, nematóides, fungos e bactérias já foram identificadas no Brasil. Esse número continua em crescimento com a expansão da soja para novas áreas de cultivo, como consequência da monocultura (YORINORI; PAIVA, 2002).

A ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) Syd. & P. Syd. é uma das doenças mais agressivas da cultura (JULIATTI et al., 2003). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação, enchimento de vagens e o peso final dos grãos (YANG et al., 1991). Em áreas onde o controle não é executado ou o é de forma tardia, os danos no rendimento têm variado entre 10 e 75% (NAVARINI et al., 2007).

Os sintomas iniciais da ferrugem são pequenas urédias de coloração castanha a marrom-escura na face inferior da folha que se rompem, liberando os urediniósporos. As lesões tendem para o formato angular e podem atingir 2 a 5 mm de diâmetro, podendo aparecer em pecíolos, vagens e caules (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Na América do Sul, a ferrugem asiática foi descrita pela primeira vez no Paraguai por Morel (2001). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em Minas Gerais, ocorrendo em diversas leguminosas (DESLANDES, 1979), mas existem controvérsias em relação ao agente causal. A preocupação com a ferrugem no Brasil teve início após grandes epidemias, em 2002 e 2003 (LIMA, 2006).

A obtenção de cultivar de soja resistente à ferrugem asiática tem sido um desafio. Entre as cultivares recomendadas, não existem ainda materiais com bom nível de resistência (NAVARINI et al., 2007; YORINORI et al., 2002) em razão da grande variabilidade do patógeno (HARTMAN; WANG; SHANMUGASUNDARAM, 1994; SINCLAIR; HARTMAN, 1995). No Japão, dezoito raças foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens (YAMAOKA et al., 2002). A disponibilidade limitada de cultivares resistentes faz com que o manejo da cultura seja feito em épocas de semeadura e de aplicação de defensivos (GODOY; CANTERI, 2004).

Entre os métodos de controle, o único disponível no momento é o químico, por meio de fungicidas (SANTOS et al., 2007). Fungicidas aplicados de forma preventiva tem se destacado como a estratégia mais eficaz no controle

desta doença (AZEVEDO, 2001; HARTMAN; WANG; TCHANZ, 1991). Como a identificação dos sintomas iniciais da ferrugem da soja é difícil (LEVY, 2005), é importante conhecer a eficiência de produtos aplicados de forma curativa, principalmente quando a doença ocorre no início do florescimento, quando produz elevados níveis de dano e quando afeta o teor de proteína no grão (OGLE; BYTH; MCLEAN, 1979).

## **2.2 Cultura do Eucalipto**

O eucalipto representa uma cultura de grande importância nacional pela produção de madeira, na indústria de papel e celulose, produção de carvão vegetal, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, entre outros. O que faz o Brasil despontar nesse setor são as condições favoráveis de clima, solo e a grande oferta de áreas para o plantio, fazendo do país um dos maiores mercados mundiais desta espécie (RECH, 2001; SILVA, 2001). O PIB em 2007 da indústria de base florestal e de madeira processada era de 57,7 bilhões de dólares, correspondendo a 4,4% do PIB nacional, com uma arrecadação de 9,5 bilhões de dólares (2,5% do total da arrecadação nacional), gerando milhões de empregos diretos e indiretos. A área plantada com eucalipto no Brasil em 2009 foi de 4.515.7 ha. Em 2008, a produção nacional de carvão vegetal foi de 8.364.000 ton. A produção de celulose total foi de 12.850.000 ton, de madeira em tora total, 115.390.000 m<sup>3</sup>; madeira serrada total, 24.987.000 m<sup>3</sup>; papel e papelão, 5.947.000 ton (CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM FLORESTAS - CIFLORESTA, 2011).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Mirtacea, com cerca de 600 espécies e subespécies crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem. Menos de 1% dessas 600 espécies têm sido usadas com propósitos industriais. Assim, o uso do

eucalipto na indústria nacional é baseado em *E. grandis* e em *E. urophylla* e seus híbridos. Mais recentemente, outras espécies como *E. globulus*, *E. dunnii*, *E. brassiana* e *E. benthamii* têm sido incorporadas aos programas de melhoramento genético a fim de aumentar a produção de celulose, a resistência ao frio e à seca, dependendo da região.

No Brasil, especialmente na Região Sudeste, o eucalipto híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (“urograndis”) vem se destacando no cenário silvicultural desde a década de 1980. Desenvolvido no Brasil, atualmente, mais de 600.000 ha são cultivados com este híbrido, constituindo a base da silvicultura clonal brasileira. O objetivo do cruzamento destas duas espécies foi obter plantas resistentes ao cancro (*Chrysoporthe cubensis*), com um bom crescimento, um leve aumento na densidade da madeira, melhorias no rendimento e propriedades físicas da celulose, rusticidade, propriedades da madeira e resistência ao déficit hídrico (AGROTECA TANABI, 2008).

As espécies de eucaliptos cultivadas estão sujeitas a mais de uma dezena de doenças fúngicas (KRUGNER; AUER, 2005). Em casa de vegetação e em jardim clonal, o oídio é uma das principais doenças (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001), podendo causar perdas significativas quando não controlado prontamente (BROWN; FERREIRA, 2000).

No caso do Brasil, não existem fungicidas registrados para o controle do oídio na cultura do eucalipto (BRASIL, 2011). Diante disso, na maioria das vezes, o controle da doença é feito de forma não recomendada, podendo acarretar vários problemas ambientais e de futura resistência dos patógenos frente aos produtos.

### 2.3 Oídio do eucalipto

O oídio do eucalipto é considerado uma das principais doenças em minijardim clonal e em casa de vegetação (FERREIRA, 1989; KRUGNER; AUER, 2005; SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001), principalmente em função da umidade, juvenilidade, proximidade das mudas e condições favoráveis ao desenvolvimento desta doença (GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER; SANTOS, 2001).

Embora raramente o oídio cause a morte das plantas, ele pode reduzir o potencial produtivo das culturas e pode afetar a qualidade do produto (STADNIK; RIVERA, 2001). Um sinal típico do patógeno é o aparecimento de uma película pulverulenta e esbranquiçada sobre a superfície das folhas. As brotações e gemas são preferencialmente infectadas e quando não morrem, causam a formação de limbos adultos enrugados, afilados e geralmente com uma metade mais estreita do que a outra. A doença dissemina-se facilmente através do contato entre plantas doentes e sadias, ou pelo vento (KRUGNER; AUER, 2005).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de uma espécie de *Oidium* sobre *Eucalyptus* foi feita por Grillo (1936). Posteriormente, *Oidium eucalypti* Rostrup. foi apresentado por Mucci, Pitta e Yokomizo (1980) como o agente etiológico da doença. A fase teleomórfica ainda não foi encontrada em eucaliptos no Brasil. Por isso, a identificação do seu agente etiológico tem sido dificultada pela ausência da fase sexual (AUER, 2001; KRUGNER; AUER, 2005).

Silva et al. (2001) concluíram que o *Oidium* do eucalipto é semelhante ao *Oidium* da roseira, descrito como *Sphaerotheca pannosa* (Vallr. ex. Fr.) Lev. Essa identificação foi baseada nos aspectos morfológicos do anamorfo. Inoculações artificiais indicaram que isolados de oídio originário de eucalipto

(*Oidium eucalypti*), roseira (*S. pannosa*) e de *Dhalia* sp. (*Erysiphe cichoracearum* DC. ex. Mérat) foram patogênicos ao eucalipto. A literatura ainda apresenta *Erysiphe orontii* Cast. do fumo, patogênico também ao eucalipto (CROP..., 2010).

Brown e Ferreira (2000) relataram sete espécies de *Oidium* em eucalipto pelo mundo. Entretanto, alguns autores utilizam *Oidium* spp. e outros *Oidium eucalypti*, para designar oídio do eucalipto de uma forma genérica.

#### **2.4 Fosfitos no controle de doenças de plantas**

Os fosfitos são compostos originados do ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ) através da neutralização por uma base que pode ser o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio entre outros, sendo o hidróxido de potássio o mais utilizado, formando o fosfito de potássio (REUVENI, 1997). Outros sais de fosfito, como de manganês, zinco e cobre também estão disponíveis comercialmente.

Os fosfitos são caracterizados como compostos não fitotóxicos que apresentam atividade fungicida na planta (COHEN; COFFEY, 1986). Estes produtos estão sendo comercializados como fertilizantes que possuem ação no controle de várias doenças (NASCIMENTO et al., 2008). Tais substâncias já tiveram sua eficiência comprovada contra oomicetos, como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Peronospora* spp. e *Plasmopora* spp. em diferentes culturas (DALBÓ; SCHUCK, 2003; FORSTER et al., 1998; GALVÃO et al., 2006; GRANT; GRANT; HARRIS, 1992; GUEST; GRANT, 1991; GUEST; PEGG; WHILEY, 1995; JEE; CHO; KIM, 2002; JACKSON et al., 2000; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001; MILLER et al., 2006; REBOLLAR-ALVITER; MADDEN; ELLIS, 2007; SILVA, A. et al., 2011; WILKINSON et al., 2001).



Os fosfitos também têm apresentado bons resultados no controle de doenças causadas por patógenos não-pertencentes ao grupo dos oomicetos, como *Colletotrichum gloeosporioides* (ZAINURI-JOYCE et al., 2001), *Fusarium oxysporum* (DAVIS; GRANT, 2001), *Venturia inaequalis* (HEATON; DULLAHIDE, 1990), *Alternaria alternata* (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003), *Penicillium expansum* (AMIRI; BOMPEIX, 2011; BLUM et al., 2007), *Venturia pirina* (PERCIVAL; NOVISS; HAYNES, 2009), *Monilinia fructicola* (MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009) e *Phoma costarricensis* (NOJOSA et al., 2009).

Alguns trabalhos chegaram a demonstrar que os fosfitos foram tão eficientes quanto os fungicidas tradicionais no controle de doenças de plantas (BLUM et al., 2007; BRACKMANN et al., 2005; PERUCH et al., 2007; WORDELL FILHO; STADNIK, 2006), podendo ser uma alternativa aos fungicidas convencionais (BLUM et al., 2007; BRACKMANN et al., 2004).

Os fosfitos são cada vez mais utilizados nos EUA e Europa no controle de fitopatógenos (KING et al., 2010). Nos EUA, os fosfitos são registrados para o controle de oomicetos. No Brasil, são registrados como adubo foliar, mas têm sido usados para controle de doenças.

Apesar de os fosfitos serem comercializados como adubo foliar, já foi comprovado que eles não têm qualquer efeito estimulante sobre o crescimento e a produtividade de plantas saudáveis (MOOR; MOREIRA, 2009; THAO; YAMAKAWA, 2009), não fornecem nutrição às plantas e, portanto, não podem complementar ou substituir o fósforo na adubação (MACINTIRE et al., 1950; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001; MOOR; MOREIRA, 2009; THAO; YAMAKAWA, 2009). A resposta positiva obtida na produção em diversos estudos pode estar relacionada à supressão das doenças nessas plantas e, ou ao estímulo-resposta de defesa das plantas contra patógenos (THAO; YAMAKAWA, 2009). Inúmeros são os trabalhos indicando que o fosfito pode

ser bem absorvido pelas folhas e raízes, mas não tem utilidade para as plantas como fonte de fósforo (CARSWELL et al., 1996; FORSTER et al., 1998; SCHROETTER et al., 2006), pois não são oxidados ou metabolizados pelas plantas (CARSWELL et al., 1996; GUEST; GRANT, 1991; VARADARAJAN et al., 2002).

Os fosfitos são considerados os únicos fungicidas sistêmicos que se translocam através do floema e xilema, seguindo o fluxo da transpiração. Essa característica é importante, pois eles podem ser aplicados como injeção em caule ou em pulverização foliar e ser transportados para os tecidos das raízes para o controle de patógenos de solo (WILKINSON et al., 2001), ou mesmo aplicados nas raízes, controlando, assim, patógenos de parte aérea (SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989), ou seja, onde quer que seja aplicado, os fosfitos vão agir tanto em patógenos da parte aérea, como do sistema radicular.

Como os fosfitos não são metabolizados pelas plantas, eles se acumulam nos tecidos (MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001) por um tempo considerável, meses ou anos, dependendo da espécie da planta (GUEST; GRANT, 1991; HARDY; BARRETT; SHEARER, 2001; MALUSA; TOSI, 2005), ficando os patógenos invasores expostos diretamente ao fosfito acumulado durante o processo de infecção (FENN; COFFEY, 1985; KING et al., 2010; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001; SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989). As concentrações de fosfito são mais elevadas nas regiões de rápido crescimento, como as raízes e brotos (WHILEY et al., 1995). A concentração em tecidos vegetais está diretamente relacionada à taxa de aplicação (SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989). Os íons complexantes como K, Ca, B, Zn, Mo, Mn, entre outros favorecem a absorção rápida dos fosfitos pelas raízes, folhas e córtex (NASCIMENTO et al., 2008), exigindo menor energia da planta.

Os fosfitos são caracterizados por apresentarem ação fungitóxica direta sobre patógenos (DELIOPOULOS et al., 2010; SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989; WILKINSON et al., 2001), indutores dos mecanismos de resistência no hospedeiro (BÉCOT et al., 2000; GUEST; GRANT, 1991; JACKSON et al., 2000; SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989) e por possuírem ação antiesporulante.

Por apresentarem ação direta contra fitopatógenos, os fosfitos causam alterações na sua morfologia. Observações citológicas revelaram que os fosfitos causam lise das paredes celulares e um efeito adverso sobre o crescimento das hifas (KING et al., 2010). Perez et al. (1995) demonstraram que níveis baixos de fosfito interferem no metabolismo do patógeno, alterando a estrutura da parede celular, o que resulta na liberação de elicitores, levando a uma indução de mecanismos de defesa das plantas. A lise das hifas resultaria na liberação de moléculas efetoras que podem influenciar o resultado da interação entre o patógeno e o hospedeiro. Perez et al. (1995) demonstraram que o fosfito aumentava a secreção de elicinas de *P. capsici* e *P. cryptogea* que estimulam os mecanismos de defesa do hospedeiro.

A ativação de defesa das plantas causadas pelos fosfitos pode induzir a reação de hipersensibilidade, o acúmulo de compostos fenólicos e a formação de agregados citoplasmáticos e de fenóis ao redor das células infectadas (DANIEL; GUEST, 2006), além de indução da produção de fitoalexinas (SALA et al., 2004), fenilalanina-amônia-liase e compostos, como a lignina e o etileno (NEMESTOTHY; GUEST, 1990; PANICKER; GANGADHARAN, 1999).

A probabilidade de que altos níveis de resistência ao fosfito é reduzida pelo fato de agirem em vários sítios de ação nos patógenos (DOBROWOLSKI et al., 2008; GUEST; GRANT, 1991). Ao contrário, os fungicidas sistêmicos visam ao metabolismo específico (PEEVER; MILGROOM, 1995) em que a mutação em um ou poucos locos dentro do patógeno pode induzir a resistência,

como relatado em vários exemplos de resistência do oídio a produtos químicos em curcubitáceas (MCGRATH, 2001).

Os fosfitos também podem reduzir a esporulação dos patógenos, possibilitando com isso a redução na intensidade das doenças (PANICKER; GANGADHARAN, 1999). Experimentos têm demonstrado que os fosfitos podem reduzir a produção de zoósporos (WILKINSON et al., 2001) e a produção de esporângios em uma variedade de espécies de *Phytophthora* (DOLAN; COFFEY, 1988; GREENHALGH et al., 1994; GUEST; GRANT, 1991; WILKINSON et al., 2001).

Os trabalhos acima demonstraram a importância dos fosfitos no controle de doenças em plantas, com mecanismo de ação direta sobre o patógeno e indireta, ativando a resposta de defesa no hospedeiro e interferindo na reprodução dos oomicetos. Outro fato é que os fosfitos não têm capacidade de aumentar a produtividade e agir como estimulante de crescimento de plantas.

## **2.5 Óleos essenciais, extrato vegetal e decocto no controle de fitopatógenos**

Sendo um dos países mais ricos do mundo em espécies vegetais, o Brasil, deve buscar substâncias que atuem sobre os fitopatógenos em suas reservas naturais e, assim, minimizar os efeitos negativos de agroquímicos, além de obter uma produção de alimentos de melhor qualidade (BETTIOL, 1991).

Segundo Stadnik e Talamini (2004), os produtos naturais de plantas podem apresentar três atividades principais: antimicrobiana, agindo direto sobre o patógeno; indutores de resistência, ativando os mecanismo de defesa da planta através de moléculas bioativas e também como bioestimulantes do crescimento da planta.

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos e óleos essenciais obtidos de plantas medicinais têm indicado o potencial dos mesmos no controle de

fitopatógenos pela indução de resistência, denotando a presença de composto com características elicitoras e agindo diretamente sobre os patógenos (KYUTARO et al., 2006; MAZARO et al., 2008; MEINERZ et al., 2008; MOTOYAMA et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Os óleos essenciais podem conter diversas substâncias orgânicas com capacidade de indução de resistência, como hidrocarbonetos, terpenos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, fúranos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre (DEWICK, 1997). Possivelmente, o óleo essencial, por ser um produto concentrado, apresente maior diversidade e concentração de substâncias com ação elicitora. Os extratos de plantas podem conter compostos, como glucanas, pectinas, antracnonas, taninos entre outros (GODARD et al., 2009).

Avancini, Wiest e Mundstock (2000) verificaram a atividade antimicrobiana do decocto de *Baccharis trimera* (carqueja) e *Tagetes minuta* (cravo-de-defunto). Os autores sugeriram a possibilidade de esses decoctos serem utilizados como desinfetantes e antissépticos. Os decoctos de alecrim, gengibre, calêndula e laranja baiana (casca) demonstraram potencial de inibição sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Decoctos de macela, camomila e tagetes também se destacaram (ROZWALKA et al., 2008). Alguns trabalhos já realizados demonstraram a eficiência do extrato vegetal (NEFID) no controle direto de fitopatógenos e na indução de mecanismos de defesa em plantas, principalmente na cultura do cafeeiro, no controle de *Phoma costarricensis*, *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda* e também em *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro (BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; SANTOS et al., 2007). Esses trabalhos demonstram a capacidade de controle de microrganismos patogênicos dos óleos essenciais, extratos e decoctos.

Nos últimos anos, o controle de fitopatógenos usando produtos alternativos têm ganhado ênfase devido ao aumento da insensibilidade do patógeno aos fungicidas sintéticos, aliada à ênfase pelas demandas em reduzir o uso de pesticidas em função de questões ambientais e de saúde.

Um grande número de plantas apresenta propriedades antifúngicas em seus extratos. Essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como o órgão utilizado, a idade e o estágio vegetativo. Fatores do ambiente, como o pH do solo, bem como a estação do ano e diferentes tipos de estresse também devem ser observados. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e na manipulação do extrato (SILVA et al., 2005).

## **2.6 Plantas medicinais de *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* e *Hyptis marruboides***

*Aloysia gratissima* (Gilles e Hook.) Tonc. (Figura A), planta silvestre conhecida como mimo-do-Brasil, alfazema-do-Brasil, entre outros é nativa do México, sendo encontrada ao Noroeste da Argentina e, no Brasil, concentrando-se na região Sul. É uma planta ornamental, melífera, apta ao paisagismo devido à intensidade da floração e ao aroma agradável das flores (RICCIARDI et al., 2000). Em relação às características medicinais, apresenta propriedades estomacais, diaforéticas, digestivas, infecções brônquicas e antigripais (BASSOLS et al., 1996).

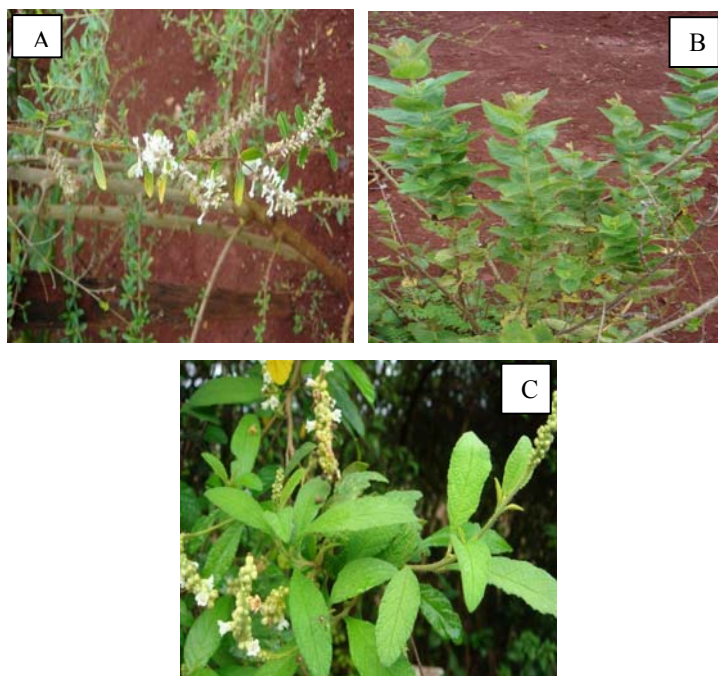


Figura 1 Plantas medicinais de *Aloysia gratissima* (A), *Hyptis marrubioides* (B) e *Cordia verbenacea* (C)

Foram relatados os efeitos de óleos de plantas do gênero *Aloysia* sobre microrganismos que causam doenças em humanos. Trabalhando com cerca de 350 espécies provenientes de diversas regiões brasileiras e do mundo, Figueira et al. (2003) observaram que *A. tryphylla*, *A. gratissima* e *A. tuberosum* apresentaram forte atividade antimicrobiana contra *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Ensaio *in vitro* demonstraram que as espécies do gênero *Aloysia* têm atividade para muitas bactérias gram-positivas responsáveis por infecções do trato respiratório em humanos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*) (CÁCERES et al., 1993). Contra fitopatógenos, o óleo essencial de *A. gratissima* proporcionou inibição no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* nas concentrações de 20,

100 e 500 ppm. Já para *F. Oxysporium*, apenas a concentração de 500 ppm apresentou inibição significativa (PINTO et al., 2007).

*Hyptis marruboides* Epling ex Hoehne (Figura B) é também conhecida como hortelã do campo e pertence à família Lamiaceae. O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do cerrado brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (HARLEY, 1988). Os óleos essenciais secretados deste gênero têm importante ação farmacológica, como anestésico, antiespasmódico e anti-inflamatório (DI STASI et al., 1996).

Estudos têm mostrado atividades biológicas importantes relacionadas ao gênero *Hyptis*, tais como: atividade antifúngica (OLIVEIRA et al., 2004), antibacteriana (SOUZA et al., 2003), larvicida (COSTA et al., 2005), dentre outros.

*Cordia verbenacea* DC. (Figura C) é uma espécie perene e arbustiva encontrada principalmente nas regiões litorâneas do Brasil. Popularmente conhecida como erva-baleeira, é uma planta com propriedades medicinais, usada como anti-inflamatório e analgésico, sendo indicada para a artrite, reumatismo e problemas de coluna (SILVA JÚNIOR; VIZZOTO; GIORGI, 1995).

Silva, O. et al. (2011) verificaram efetivo controle preventivo da ferrugem asiática da soja com os óleos essenciais de *A. gratissima*, *C. verbenacea* e *H. marruboides* em testes *in vitro* e *in vivo*. Silva (2009) verificou que esses mesmos óleos essenciais afetaram a germinação, o crescimento e a reprodução do fungo *C. truncatum* em teste *in vitro*. Foi verificado também que esses óleos foram eficientes no tratamento de semente de soja no controle do *C. truncatum* e que, mesmo na concentração de 1%, houve uma equivalência de eficácia entre eles e o tratamento padrão com fungicida químico carbendazim.



## REFERÊNCIAS

- AGROTECA TANABI. **Vendas de mudas de eucalipto**. Disponível em: <[http://www.agrotecatanabi.com.br/vendasmudas\\_eucalipto.html005](http://www.agrotecatanabi.com.br/vendasmudas_eucalipto.html005)>. Acesso em: 16 jul. 2008.
- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 222-227, Apr. 2011.
- AUER, C. G. Oídios de espécies florestais. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 391-418.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F. dos. Oídio em eucaliptos no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 264, 1999. Resumo. Suplemento.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 3, p. 230-234, jun. 2000.
- AZEVEDO, L. A. S. de. **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo: EDUSP, 2001. 230 p.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.
- BASSOLS, S. M. **Espécies del género *Lippia* utilizadas em medicina popular latinoamericana**. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 1996. 60 p. (Dominguezia, 13).
- BÉCOT, S. et al. Phytogard (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 6, p. 417-425, Dec. 2000.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (Documentos, 15).

BLUM, L. E. B. et al. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 265-268, 2007.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1-6.

BRACKMANN, A. et al. Controle de podridão pós-colheita de *Penicillium* spp., em maçã 'Fuji' com fosfitos e fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 251-254, 2005.

\_\_\_\_\_. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs 'Fuji' durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1039-1042, jul./ago. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **AGROFIT**: sistema de agrotóxico fitossanitário. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 30 mar. 2011.

BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P. J. et al. (Ed.). **Diseases and pathogens of eucalypts**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 119-151.

CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 38, n. 1, p. 31-38, Mar. 1993.

CÂMARA, G. M. S. **Soja**: tecnologia da produção. Piracicaba: ESALQ, 1998. 293 p.

CARSWELL, M. C. et al. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, n. 1, p. 105-110, Jan. 1996.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM FLORESTAS. **Tecnologia da madeira**. Disponível em: <<http://www.ciflorestas.com.br/>>. Acesso em: 14 set. 2011.

COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 311-338, 1986.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira:** grãos, intenção de plantio segundo levantamento, novembro/2010. Disponível em: <[http://www.agopa.com.br/NetManager/documentos/2\\_levantamento\\_conab\\_2010.2011.pdf](http://www.agopa.com.br/NetManager/documentos/2_levantamento_conab_2010.2011.pdf)>. Acesso em: 14 set. 2011.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Conheça a ferrugem:** tabela de custo. Disponível em: <[http://www.consorcioantiferrugem.net/index.php?download=tabela\\_custos\\_ferrugem%202008.pdf](http://www.consorcioantiferrugem.net/index.php?download=tabela_custos_ferrugem%202008.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2011.

COSTA, J. C. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

CROP protection compendium: datasheet: *Erysiphe orontii*. Disponível em: <<http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?BAYERcode=OIDIBE>>. Acesso em: 28 nov. 2010.

DALBÓ, M. A.; SCHUCK, E. Avaliação do uso de fosfitos para o controle do míldio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 33-35, 2003.

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

DAVIS, A. J.; GRANT, B. R. The effect of phosphonate on the sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 25, n. 1, p. 31-35, Jan. 2001.

DELIOPOULOS, T. et al. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, Oct. 2010.

DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 337-339, 1979.

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

- DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 120 p.
- DOBROWOLSKI, M. P. et al. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 928-936, Sept. 2008.
- DOLAN, T. E.; COFFEY, M. D. Correlative *in vitro* and *in vivo* behaviour of mutant strains of *Phytophthora palmivora* expressing different resistances to phosphorous acid and fosetyl-Na. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 5, p. 974-978, 1988.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja, região central do Brasil, 2005**. Londrina, 2004. 239 p.
- FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Studies of *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 606-611, 1984.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FIGUEIRA, G. M. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de espécies da coleção de plantas medicinais do CPQBA/UNICAMP. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2003. p. 34.
- FORSTER, H. et al. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of peppers to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. **Plant Disease**, Chicago, v. 82, n. 10, p. 1165-1170, Oct. 1998.
- GALVÃO, S. et al. Avaliação de eficiência de produtos alternativos para o controle do míldio e da antracnose em videira, cultivar Niágara Branca. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 19, n. 4, p. 91-93, 2006.
- GODARD, S. et al. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 4, p. 827-837, Aug. 2009.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 97-101, jan./fev. 2004.

GRANT, B. R.; GRANT, J.; HARRIS, J. Inhibition of growth of *Phytophthora infestans* by phosphate and phosphonate in defined media. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 16, n. 2, p. 240-244, Apr. 1992.

GREENHALGH, F. C. et al. Control of *Phytophthora* root rot of irrigated subterranean clover with potassium phosphonate in Victoria. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 43, n. 5, p. 1009-1019, Nov. 1994.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. **Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 2001. 6 p. (Circular Técnica, 47).

GRILLO, H. V. S. Lista preliminar dos fungos assinalados em plantas do Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 39-96, 1936.

GUEST, D.; GRANT, B. R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 159-187, Apr. 1991.

GUEST, D. L.; PEGG, K. G.; WHILEY, A. W. Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates. **Horticultural Reviews**, New York, v. 17, n. 2, p. 299-330, Apr. 1995.

HARDY, G. E. S. T. J.; BARRETT, S.; SHEARER, B. L. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 30, n. 1, p. 133-139, Jan. 2001.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1., 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean rust research: progress and future prospects. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1., 1994, Chang Mai. **Proceedings...** Chang Mai: SSR, 1994. p. 180-186.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; TCHANZ, A. T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, Chicago, v. 75, n. 3, p. 596-600, Mar. 1991.

HEATON, J. B.; DULLAHIDE, S. R. Efficiency of phosphonic acid in other pathogen systems. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 19, p. 133-134, Apr. 1990.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, Bronx, v. 24, p. 408-421, 1970.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 49, n. 1, p. 147-154, 2000.

JEE, H. J.; CHO, W. D.; KIM, C. H. Effect of potassium phosphonate on the control of *Phytophthora* root rot of lettuce in hydroponics. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 18, n. 3, p. 142-146, 2002.

JULIATTI, F. C. et al. Doenças da soja. **Cultivar**, Pelotas, v. 47, p. 3-14, 2003.

KING, M. et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 2, p. 425-435, Apr. 2010.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 319-332.

KYUTARO, K. et al. Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 14, p. 1520-1529, 2006.

LEVY, C. Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. **Plant Disease**, Chicago, v. 89, n. 3, p. 669-674, Mar. 2005.

LIMA, L. M. **Manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) com fungicidas e silício**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MACINTIRE, W. H. et al. Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous and phosphoric materials by means of pot cultures. **Agronomy Journal**, Madison, v. 42, p. 543-549, 1950.

MALUSA, E.; TOSI, L. Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: results of field trials. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 3, p. 541-548, June 2005.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, dez. 2008.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 24, n. 7, p. 1505-1519, Sept. 2001.

MCGRATH, M. T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. **Plant Disease**, Chicago, v. 85, n. 1, p. 236-245, Jan. 2001.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, Feb. 2009.

MEINERZ, C. C. et al. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 26-31, 2008.

MILLER, J. et al. Post-harvest applications of zoxamide and phosphite for control of potato tuber rots caused by oomycetes at harvest. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 83, n. 3, p. 269-278, 2006.

MOOR, U.; MOREIRA, L. M. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 264-269, 2009.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 405-411, mar./abr. 2009.

MOREL, W. **Roya de la soja**. Itapúa: Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2001. (Série Fitopatológica, 1). Disponível em: <<http://planetasoya.com/trabajos/trabajos800.php?id1=7562&publi=&idSec=11&id2=7565>>. Acesso em: 10 maio 2011.

MOTOYAMA, M. M. et al. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 491-496, 2003.

MUCCI, E. S. F.; PITTA, G. P. B.; YOKOMIZO, N. K. S. O oídio em mudas de eucalipto. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, Piracicaba, v. 34, n. 1, p. 27-38, 1980.

NASCIMENTO, A. et al. Fontes de fosfíto e acibenzolar-s-metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 53-59, 2008.

NAVARINI, L. et al. Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura da soja. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 182-186, 2007.

NEMESTOTHY, G. S.; GUEST, D. I. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, n. 3, p. 207-219, 1990.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

OGLE, H. J.; BYTH, D. E.; MCLEAN, R. Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in South-eastern Queensland. **Australian Journal Agriculture Research**, Melbourne, v. 30, p. 883-893, 1979.

OLIVEIRA, C. M. A. de et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 756-759, July/Aug. 2004.



PANICKER, S.; GANGADHARAN, K. Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 115-118, Apr. 1999.

PEEVER, T. L.; MILGROOM, M. G. Fungicide resistance: lessons for herbicide resistance management? **Weed Technology**, Champaign, v. 9, n. 3, p. 840-849, May 1995.

PERCIVAL, G.; NOVISS, K.; HAYNES, I. Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (*Venturia inaequalis*) and pear (*Venturia pirina*) scab. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 4, p. 629-633, Aug. 2009.

PEREIRA, R. B. 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. 1287-1286, out. 2008.

PEREZ, V. et al. Enhanced secretion of elicitors by *Phytophthora* fungi exposed to phosphonate. **Cryptogamie Mycologie**, Netherlands, v. 16, n. 2, p. 191-994, 1995.

PERUCH, L. A. M. et al. Biomassa cítrica, extrato de algas, calda bordalesa e fosfitos no controle do míldio da videira, cv. Niágara Branca. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 6, n. 2, p. 143-148, 2007.

PINTO, J. E. B. P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

REBOLLAR-ALVITER, A.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. Pre-and Post-infection activity of azoxystrobin, pyraclostrobin, mefenoxam and phosphite against leather rot of strawberry, caused by *Phytophthora cactorum*. **Plant Disease**, Chicago, v. 91, n. 3, p. 559-564, Mar. 2007.

RECH, C. Um futuro promissor. **Revista da Madeira**, Curitiba, v. 11, n. 59, p. 4, set. 2001. Edição especial.

REUVENI, M. Post-infection applications of  $K_3PO_3$ , phosphorous acid and dimethomorph inhibit development of downy mildew caused by *Plasmopara viticola* on grapes. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, Binghamton, v. 5, n. 1, p. 27-38, 1997.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by  $\alpha$ -aminobutyric acids and potassium phosphates. **Plant Disease**, Chicago, v. 87, n. 8, p. 933-936, 2003.

RICCIARDI, G. A. L. et al. Examen de los aceites esenciales de especies de *Aloysia* (Verbenaceae) del Nordeste. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas del Universidad Nacional Del Nordeste**, San Lourenzo, v. 8, n. 1, p. 100-102, 2000.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, mar./abr. 2008.

SALA, F. C. et al. Phosphite effect on hot and sweet pepper reaction to *Phytophthora capsici*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 462-495, 2004.

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SANTOS, J. A. et al. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 443-447, mar. 2007.

SCHROETTER, S. et al. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). **Landbauforschu Volk**, Berlin, v. 56, n. 3/4, p. 87-99, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e 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.

SILVA, A. C. **Óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum truncatum* e ferrugem asiática em soja**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, A. C. et al. Essential oils for preventative treatment and control of Asian soybean rust. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 2011. In press.

SILVA, J. de C. A madeira do futuro. **Revista da Madeira**, Curitiba, v. 11, n. 59, p. 4-6, 2001.

SILVA, M. B. da et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 221-246.

SILVA, M. D. D. et al. Etiologia do oídio do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 201-205, mar./abr. 2001.

SILVA, O. C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 6, p. 598-604, June 2011.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTO, V. J.; GIORGI, E. **Plantas medicinais caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 71 p. (Boletim Técnico, 68).

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Management of soybean rust. In: SOYBEAN RUST WORKSHOP, 1., 1995, Urbana. **Proceedings...** Urbana: College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, 1995. p. 6-10.

\_\_\_\_\_. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 3-4.

SMILLIE, R.; GRANT, B.; GUEST, D. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 9, p. 921-926, Sept. 1989.

SOUZA, L. K. H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, 2003.

STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. 484 p.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 45-62.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? **Soil Science & Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 228-234, Apr. 2009.

VARADARAJAN, D. K. et al. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 1232-1240, July 2002.

WHILEY, A. W. et al. Changing sink strengths influence translocation of phosphonate in avocado (*Persea americana* Mill.) trees. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 46, n. 5, p. 1079-1090, 1995.

WILKINSON, C. J. et al. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 50, n. 5, p. 587-593, Sept. 2001.

WORDELL FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Controle da mancha acinzentada da cebola e seu impacto sobre a qualidade de mudas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 437-441, maio/jun. 2006.

YAMAOKA, Y. et al. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 52-56, 2002.

YANG, X. B. et al. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 11, p. 1420-1426, Nov. 1991.

YORINORI, J. T. et al. Reações de cultivares de soja a ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*). In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 24., 2002, São Pedro. **Anais...** São Paulo: EDUSP, 2002. p. 149.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi*** Sydow. Londrina: EMBRAPA soja, 2002. 4 p.

ZAINURI JOYCE, D. C. et al. Effects of phosphonate and salicylic treatments on anthracnose disease development and ripening of 'Kensington Pride' mango fruit. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 41, n. 4, p. 805-813, 2001.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO 1**

**Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* inhibit the progress of Asian soybean rust**

Normas da Revista Científica European Journal of Plant Pathology (versão preliminar)

**Abstract** The objective of this study was to investigate the effects of the essential oils derived from *Hyptis marrubioides* Epling ex Hoehne, *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and *Cordia verbenacea* DC. in controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) Syd. & P. Syd. The inhibitory activities of the essential oils (applied in the concentration range 0.05 – 2%) on the urediniospores germination of *P. pachyrhizi* were investigated through *in vitro* assays. The curative and eradication properties of the oils (applied in the concentration range 0.05 – 0.5%) were studied under greenhouse conditions using the *P. pachyrhizi*-susceptible soybean cultivar MGBR-46/Conquista. The scanning electron microscopy was employed to investigate the essential oils effect on the morphology of *P. pachyrhizi* urediniospores. Treatment with essential oils at all concentrations tested led to the total inhibition of spore germination *in vitro*. Curative application of the essential oils inhibited disease progression by 33 to 41%, whereas the commercial fungicide (pyraclostrobin/epoxiconazole) employed as positive control was 61% effective. Treatment of infected plants with essential oils produced morphological alterations in fungal structures that were similar to those produced by the commercial fungicide, namely, shriveling of urediniospores, appressoria, germ tube and paraphyses. The results obtained establish the potential value of the studied essential oils in curative treatments against *P. pachyrhizi* infection. These natural products not only offer an alternative to the use of synthetic fungicides but could also find application in organic and conventional farming.

**Keywords:** Alternative control of plant disease • Scanning electron microscopy  
• *Glycine max* • *Phakopsora pachyrhizi*

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Hyptis marruboides* Epling ex Hoehne, *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Cordia verbenacea* DC. no controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) Syd. & P. Syd. Nas concentrações de 0,05-2% sobre a germinação dos urediniósporos da *P. Pachyrhizi*, as atividades inibitórias dos óleos essenciais foram testadas através de ensaios *in vitro*. As propriedades curativas e erradicantes dos óleos aplicados na faixa de concentração de 0,05-0,5% foram estudadas em casa de vegetação, usando a cultivar de soja MGBR-46/Conquista, considerada susceptível à ferrugem asiática. Microscopia eletrônica de varredura foi empregada para investigar o efeito de óleos essenciais sobre a morfologia dos urediniósporos da *P. pachyrhizi*. Em todas as concentrações testadas, os óleos essenciais inibiram totalmente a germinação dos esporos *in vitro*. Aplicação curativa dos óleos essenciais inibiu o progresso da doença entre 33 e 41%, enquanto o fungicida comercial (piraclostrobina/epoxiconazole), empregado como controle positivo resultou em 61% de controle. Os óleos essenciais causaram alterações morfológicas nos urediniósporos, apressórios, tubo germinativo e paráfase, semelhantes ao fungicida comercial. Os resultados obtidos demonstram o valor potencial dos óleos essenciais estudados no tratamento curativo da ferrugem asiática. Estes produtos naturais não só oferecem uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos, mas também poderiam ser utilizados na agricultura orgânica e convencional.

**Palavras-chave:** Controle alternativo de doenças de plantas • Microscopia eletrônica de varredura • *Glycine max* • *Phakopsora pachyrhizi*



## Introduction

The productivity and profitability of a soybean crop can be diminished drastically following attack by pathogenic microorganisms. Asian soybean rust, the causal agent of which is the air-borne fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd (Yang et al. 1990; 1991a, b; Andrade and Araripe-Andrade 2002), is one of the most destructive diseases affecting this important culture. The initial symptoms include the appearance of small discolored necrotic areas on the surface of the leaves, while the untreated disease can progress rapidly leading to premature leaves loss and, depending on the developmental stage of the plant, abnormal pod production with reduced seed fill and smaller seed size (Yang et al. 1991b). According to studies conducted in various soybean-growing regions, the reduction in yield induced by Asian rust can vary between 10 and 100% (Hartman et al. 1991; Yorinori et al. 2005; McLaren 2008). In Brazil, it has been estimated that the cumulative total losses, including reduced productivity and revenue plus the cost of disease control, associated with Asian rust reached US\$ 10.1 billion in the period from the earliest severe epidemics up until the 2007/2008 harvesting season (Consórcio Antiferrugem 2008).

Currently no soybean cultivars offer adequate resistance to Asian rust (Navarini et al. 2007; Ribeiro et al. 2007) and hence control of the disease requires the adoption of a variety of alternative measures. When the infection is already established, the use of triazole and estrobilurine fungicides is unavoidable (Patil and Anahosur 1998; Miles et al. 2003; Godoy and Canteri 2004). However, the continuous use of such specific fungicides favors the selection of pathogen resistant strains, and it is necessary to alternate such products with others that act via different mechanisms (Kimati 1987).

Plant-based products not only provide alternatives to the synthetic fungicides, but their application is generally less harmful to man and the environment. The essential oils from a variety of plant species have been shown

to be very effective in the control of plant diseases (Medice et al. 2007; Silva et al. 2009; Al-Reza et al. 2010; Chaijuckam and Davis 2010), while oils from a number of traditional Brazilian medicinal plants, including *Hyptis marrubioides* Epling ex Hoehne (Lamiaceae), *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. (Verbenaceae) and *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae), are known to be effective against phytopathogens (Silva et al. 2009, 2011). In order to evaluate the application of these plant species in disease control, our research group undertook the task of investigating the curative effects of the essential oils derived therefrom against Asian soybean rust.

## **Material and methods**

### **Preparation of essential oils**

Plants of *H. marrubioides*, *A. gratissima* and *C. verbenacea* were cultivated in the medicinal garden at the campus of the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais state, Brazil. Voucher specimens were deposited in the herbarium at UFLA with reference numbers 1022, 19810 and 7982, respectively. Aerial parts of each plant were collected in morning periods during February 2008, and immediately comminuted and transferred to a modified Clevenger apparatus. Hydrodistillation was continued for 2 h and the essential oil that collected was separated and stored at - 40°C in aluminum foil-wrapped glass vials until required for assay.

### **Preparation of urediniospores of *P. pachyrhizi***

Urediniospores were scraped from the leaves of naturally infected soybean plants growing in the fields of the university campus. Spores were passed through a 60 mesh sieve, collected onto aluminum foil and subsequently suspended in distilled water containing 1% Tween 20. Spore density was

adjusted by appropriate dilution after counting under a light microscope with the aid of a Neubauer chamber. Spore viability was estimated prior to inoculation onto the growth medium.

**Effects of essential oils on the germination of *P. pachyrhizi* urediniospores *in vitro***

The essential oils were mixed separately with 1% Tween 20 in water in order to produce concentrated emulsions, aliquots of which (1 mL) were combined with 9 mL of autoclaved water-agar medium, maintained just above the melting point of agar, and poured immediately into 9 cm diameter Petri dishes. The final concentrations of oils in the media were 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%. Following solidification of the medium, an aliquot (50  $\mu$ L) of spore suspension (containing  $2 \times 10^4$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) was placed onto the agar and spread evenly across the surface, after which the plates were sealed. Inoculated dishes were incubated at 25 °C for 4 h in the dark, following which the numbers of germinating spores were counted in samples of 200 spores located in each quadrant of the dish. A urediniospore was germinated when the length of its germ tube was equal to or greater than the spore diameter.

The assays were conducted in triplicate, with each dish representing a replicate, according to a completely randomized design with three different essential oils x seven different oil concentrations plus two controls. In the negative (untreated) control, a 1 mL aliquot of water containing 1% Tween 20 replaced the essential oil emulsion, while in the positive control the test emulsion was replaced by a 1 mL aliquot of fungicide solution containing 2.22 mg of pyraclostrobin and 0.83 mg of epoxiconazole.

### **Effects of essential oils on *P. pachyrhizi*-infected soybean plants *in vivo***

In order to assess the curative and eradicating properties of the essential oils, *in vivo* assays were carried out using soybean plants that had been artificially infected with Asian rust. Seeds of the *P. pachyrhizi*-susceptible soybean cultivar MGBR-46/Conquista were germinated in plastic pots containing 3 kg of substrate (soil:sand:manure; 2/1/2 by weight). After 30 days the seedlings were pricked out to leave two plantlets per pot, and after 40 days a cover fertilizer was applied following the recommendations of Novais et al. (1991). At the start of flowering (phenological stage R1), plants were inoculated with a suspension of *P. pachyrhizi* urediniospores (containing  $2 \times 10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) and subsequently enclosed in transparent plastic bags in order to provide a humid saturated environment for 12 h. Inoculated plants were maintained in a greenhouse, the temperature and humidity of which were constantly monitored with the aid of an Impac (São Paulo, SP, Brazil) model TH 508 thermohygrograph. The conditions employed (average temperature in the range 17.5 – 30.2°C; relative humidity 74.6%) were considered favorable for the development of soybean rust (Kochman 1979; Reis and Bresolin 2004).

Assay of the essential oils commenced on the 14<sup>th</sup> day after inoculation of the plants. Four pairs of leaves were selected in the middle of each plant comprising two pairs that showed no signs of disease and two pairs that presented a low level of infection (defined in terms of a minimum score according to the diagrammatic scale proposed by Godoy et al. (2006)). These leaves were marked and subsequently re-evaluated for severity of disease (according to the scale mentioned above) every 7 days, providing seven evaluations each in total. The area under the disease-progress curve was calculated according to the method of Campbell and Madden (1990). Experimental plants were treated with essential oils at concentrations of 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5% (as emulsions in water containing 1% Tween 20) every 10

days following the first evaluation. Controls plants were treated in exactly the same manner but with either 1% Tween 20 in water (negative control) or commercial fungicide mixture (positive control) replacing the essential oil emulsion. The assays were conducted in quintuplicate, with each pot representing a replicate, according to a randomized block design with three different essential oils x four different oil concentrations plus two controls. The complete experiment comprised 70 pots, with each pot containing two plants.

### **Scanning electron microscopy (SEM)**

The effects of the essential oils on the morphology of *P. pachyrhizi* urediniospores were evaluated by SEM. Soybean plants that were severely infected with *P. pachyrhizi* were treated with essential oils at concentrations of 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5% (as emulsions in water containing 1% Tween 20). Controls plants were treated with either 1% Tween 20 in water (negative control) or commercial fungicide mixture (positive control). Seventeen hours after treatment, selected leaves containing the phytopathogen were removed from plants and prepared for SEM analysis following the methodology described by Medice et al. (2007).

### **Statistical analysis**

All assays were performed in duplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA): normality and homogeneity of variance were evaluated by inspection of the residual plots and no deviations from the assumptions were observed. Tukey tests ( $\alpha = 0.05$ ) were applied in order to determine the significance of the differences between mean values.

## Results

Incubation of *P. pachyrhizi* urediniospores on water-agar medium supplemented with 1 mL of water containing 1% Tween 20 (negative control) allowed 74% spore germination. In contrast, addition of 1 mL of water: Tween 20 emulsions of the essential oils from *H. marruboides*, *A. gratissima* or *C. verbenacea* led to the total inhibition of spore germination irrespective of the oil concentration. The fungicide also inhibited germination by 100%.

ANOVA revealed that there were no double or triple interactions between the factors studied *in vivo* and that each acted independently (Table 1). The experiments demonstrated that the essential oils from the three species studied were equally effective in controlling asian soybean rust (Table 2), although they were less efficient than the commercial fungicide employed as the positive control. Regarding the curative effects of different essential oil concentrations, no significant differences were detected between any of the treatments applied, from which it is evident that even at the lowest concentration (0.05%) the studied oils were able to control the disease (Table 1). Although the essential oils exerted a curative effect on soybean plants, none was able to impede the development of *P. pachyrhizi* or to eradicate the disease completely. However, it was noted that leaves that had exhibited no signs of rust on the 14<sup>th</sup> day after inoculation and had received essential oil treatment every 10 days, showed less progression of the disease compared with leaves that had already presented signs of rust (Figure 1).

The treatment of infected plants with essential oils induced morphological alterations in fungal structures that were similar to those produced by the commercial fungicide. Even the lowest concentration of essential oils gave rise to urediniospores, appressoria, germ tubes and paraphyses that were shriveled in comparison with those observed in infected plants that had been treated only with water containing 1% Tween 20 (Figure 2).

## Discussion

The results of the present study demonstrate that essential oils from the traditional Brazilian medicinal plants *H. marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* contain components that are toxic to urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*. Treatment of artificially infected plants with these essential oils, or with a commercial fungicide containing pyraclostrobin and epoxiconazole, inhibited fungal germination and induced morphological changes in fungal structures that were not detected in the untreated (negative) controls. The observed alterations were in agreement with previous studies (Fiori et al. 2000; De Billerbeck et al. 2001; Soylu et al. 2006, 2007; Medice et al. 2007) involving the effect of oils from different plant species on fungi other than *P. pachyrhizi*. It has been suggested that such alterations result from cytoplasmic leakage as well as from the disruption of the enzyme-mediated synthesis of fungal cell walls caused by lipophilic oils (Sharma and Tripathi 2006; Soylu et al. 2007).

Although considerable research attention has been focused on the effects of essential oils on phytopathogens, studies involving the use of such natural products in the control of the pathosystem soybean-*P. pachyrhizi* are scarce. Medice et al. (2007) reported that application of essential oils from *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica* and *Thymus vulgaris* to soybean cultivars Conquista and Suprema reduced the density of rust pustules on infected leaves. Medice (2007) also reported that one preventive and two curative applications of essential oils from these species, as well as that from *Melaleuca alternifolia*, were effective in the control of soybean rust. In contrast, the application of extracts of citric biomass to soybean plants was ineffective against *P. pachyrhizi* infection, although it was successful in reducing the severity of infections by *Peronospora manshurica* (62%) and *Microsphaera diffusa* (35%) (Kuhn et al. 2009).

The essential oils assayed also presented, even at very low concentrations, a curative effect against soybean rust on infected plants growing under greenhouse conditions. This result is significant because it suggests that the essential oils could be employed in the control of rust in the field. Moreover, it would appear that oil concentrations lower than the minimum levels assayed in the present study could also be effective.

Silva et al. (2011) have previously demonstrated that preventative spraying with essential oils from *H. marrubioides*, *A. gratissima* and *C. verbenacea* was effective in controlling the *P. pachyrhizi* infection. In this study, the oils were found to be efficient at very low concentrations (0.05%) but, in contrast to the present findings, their efficacy in the prevention of soybean rust improved with increased concentration. Moreover, preventative application of the essential oils reduced the progress of rust disease and afforded 52 to 80% protection in comparison with 92% effectiveness provided by the commercial fungicide employed as the positive control. In the present study, the curative application of the essential oils imparted 33 to 41% protection whereas the fungicide mixture was 61% effective.

According to Hartman et al. (1991), the preventative application of fungicides represents the most appropriate strategy for controlling soybean rust, a hypothesis that is confirmed by the reported effects of the commercial fungicide used as positive control in the studies mentioned above. Additionally, the essential oils presently studied were more effective when applied in a prophylactic manner rather than for curative purposes. However, it is difficult to detect soybean rust at an early stage since the initial symptoms are not unique to this disease (Levy 2005). For this reason, it is essential to investigate products that could be used in the treatment of rust infected crops in order to minimize the consequential economic losses.



A relevant result presented herein is the fact that the progress of Asian rust was smaller in oil-treated leaves that showed no symptoms than in those already exhibiting signs of the disease. Indeed, several studies have shown that the curative efficacy of fungicides generally diminishes when application is delayed (Miles et al. 2003; Godoy and Canteri 2004), while the results of Scherm et al. (2009) confirm that fungicide should be applied prior to the emergence of soybean rust, or at the latest when the first signs of infection become visible, otherwise the success of treatment could be reduced. Generally, however, application of fungicides during the vegetative stage is ineffective and uneconomical (Miles et al 2003; Yang and Robertson 2005).

In the present investigation, essential oil treatments were sprayed during the reproductive R1 stage, which is considered a critical period in which soybean plants are particularly susceptible to *P. pachyrhizi* infection. Although the study verified that the essential oils could be used for both prophylactic and curative purposes, it is important to stress that, in the former case, the longer the interval between application of the oils and the onset of infection the less successful will be the results (Carneiro et al. 2007; Silva et al. 2011). Such findings highlight the importance of monitoring soybean crops from the very beginning of the reproductive stage, particularly when the environmental conditions are favorable to the development of the phytopathogen.

In the present study, a commercial fungicide containing pyraclostrobin and epoxiconazole (positive control) was more effective as a curative treatment against soybean rust than any of the essential oils assayed. Pyraclostrobin is a member of the strobilin class of pesticides and acts systemically by disrupting the early events in fungal development, i.e. spore germination and elongation of the germ tube (Bartlett et al. 2002; Tenuta et al. 2005). Epoxiconazole is a triazole fungicide that affects later stages of fungal development such as mycelial growth and the fungal cycle (O'Leary and Sutton 1986; Tsuda et al. 2004; Tenuta et al.

2005). In contrast, plant-derived fungicides generally comprise multi-component combinations that exhibit a variety of mechanisms of action (Sharma and Tripathi 2006) that may include direct toxicity (Medice et al. 2007; Silva et al. 2009; Al-Reza et al. 2010; Chaijuckam and Davis 2010), stimulation of mechanisms of plant resistance (Jayaraj et al. 2008; Devaiah et al. 2009; Godard et al. 2009) and systemic action on plant cells (Sundaram et al. 1995; Shivashankar et al. 2000; Itako et al. 2008). The lower efficacy of the essential oils in comparison with the commercial fungicide may be related to the high volatility and rapid degradability of the former when exposed to free air, intense light and/or high temperature (Simões and Spitzer 2000; Ruddick 2008).

Although the studied essential oils were unable to eradicate *P. pachyrhizi* infection completely, it was possible to observe a significant curative effect in terms of diminished disease progress in treated plants grown under greenhouse conditions, alterations in fungal development as revealed by SEM, and reduced spore germination as established by *in vitro* assay. It is of significance to note that systemic fungicides (azoxystrobin, carbendazim, tebuconazole, difenoconazole and epoxiconazole/pyraclostrobin mixture) are also incapable of completely eradicating soybean rust (Godoy and Canteri 2004).

The results presented herein establish the potential value of the essential oils from *H. marruboides*, *A. gratissima* and *C. verbenacea* in curative treatments against *P. pachyrhizi* infection. These natural products not only offer an alternative to the use of synthetic fungicides but could also find application in organic and conventional farming. It would be of interest to establish different formulations of these oils that would allow the retention of residual activity, and to investigate their efficacy against other soybean pathogens.

**Acknowledgements** The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a scholarship

awarded to one of us, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support for the project.

## References

- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y. & Kang, S. C. (2010). Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *96*, 86–92.
- Andrade, P. J. M. & Araripe-Andrade, D. F. A. (2002). *Ferrugem asiática: uma ameaça a soja cultura brasileira. Circular técnica, 11*. (Brasília: Embrapa Agropecuária Oeste).
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, *58*, 649–662.
- Campbell, C. L. & Madden, L. V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*. (New York: John Wiley).
- Carneiro, S. M. T. P. G., Pignoni, E., Vasconcellos, M. E. C. & Gomes, J. C. (2007). Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, *33*, 34-39.
- Chajuckam P. & Davis, R. M. (2010). Efficacy of natural plant products on the control of aggregate sheath spot of rice. *Plant Disease*, *94*, 986-992.
- Consórcio Antiferrugem. (2008). Conheça a ferrugem: Tabela de custo. Retrieved May 2, 2011, from [http://www.consorcioantiferrugem.net/index.php?download=tabela\\_custos\\_ferrugem%202008.pdf](http://www.consorcioantiferrugem.net/index.php?download=tabela_custos_ferrugem%202008.pdf).

- De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L. & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 9–17.
- Devaiah, S. P., Mahadevappa, G. H. & Shetty, H. S. (2009). Induction of systemic resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) against downy mildew (*Sclerospora graminicola*) by *Datura metel* extract. *Crop Protection*, 28, 783–791.
- 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*. *Journal of Phytopathology*, 148, 483–487.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O. & Gindro, K. (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 827–837.
- Godoy, C. V. & Canteri, M. G. (2004). Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 97-101.
- Godoy, C. V., Koga, L. J. & Canteri, M. G. (2006). Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 1, 63-68.
- Hartman, G. L., Wang, T. C. & Tschanz, A. T. (1991). Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. *Plant Disease*, 75, 596-600.
- Itako, A. T., Schwan-Estrada, K. R. F., Tolentino-Júnior, J. B., Stangarlin, J. R. & Cruz, M. E. (2008). Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Tropical Plant Pathology*, 33, 241-244.

- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M. & Punja, Z. K. (2008). Seaweed extract reduces foliar diseases on carrot. *Crop Protection*, 27, 1360–1366.
- Kimati, H. (1987). Resistência de fungos fitopatogênicos a substâncias químicas usadas no controle de doenças de plantas. *Summa Phytopathologica*, 13, 72-74.
- Kochman, J. K. (1979). The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 30, 273-277.
- Kuhn, R. A., Portz, R. L. & Stangarlin, J. R. (2009). Uso da biomassa cítrica no controle de doenças da soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 8, 85-98.
- Levy, C. (2005). Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. *Plant Disease*, 89, 669-674.
- McLaren, N. W. (2008). Reaction of soybean cultivars to rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. *South African Journal of Plant and Soil*, 25, 49–54.
- Medice, R. (2007). *Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (Phakopsora pachyrhizi) da soja*. MSc Dissertation. Universidade Federal de Lavras.
- Medice, R., Alves, E., Assis, R. T., Magno Júnior, R. G. & Lopes, E. A. G. L. (2007). Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 83-90.
- Miles, M. R., Hartman, G. L., Levy, C. & Morel, W. (2003). Current status of soybean rust control by fungicides. *Pesticide Outlook*, 14, 197-200
- Navarini, L., Dallagnol, L. J., Balardin, R. S., Moreira, M. T., Meneghetti, R. C. & Madalosso, M. G. (2007). Controle químico da ferrugem Asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura da soja. *Summa Phytopathologica*, 33, 182-186.

- Novais, R. F., Neves, J. C. L. & Barros, N. F. (1991). Ensaio em ambiente controlado. (In A. J. Oliveira, W. E. Garrido, J. D. Araújo & S. Lourenço (Eds.), *Métodos de pesquisa em fertilidade do solo* (pp. 189 – 253). Brasília: EMBRAPA/SEA).
- O’Leary, A. L. & Sutton, T. B. (1986). Effects of postinfection applications of ergosterol biosynthesis-inhibiting fungicides on lesion formation and pseudothecial development of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, *76*, 119–124.
- Patil, P. V. & Anahosur, K. H. (1998). Control of soybean rust by fungicides. *Indian Phytopathology*, *51*, 265-268.
- Reis, E. M. & Bresolin, A. C. R. (2004). Ferrugem da soja: revisão e aspectos técnicos. (In C. A. Focelini, E. M. Reis, F. Gossen, J. T. Yorimori, L. Hoffmann, L. Costamilan, O. C. Silva, R. Balardin & R. T. Casa (Eds.), *Doenças na cultura da soja* (pp. 55-70). Passo Fundo: Editora Aldeia Norte.
- Ribeiro, A. S., Moreira, J. U. V., Pierozzi, P. H. B., Rachid, B. F., Toledo, J. F. F., Arias, C. A. A., Soares, R. M. & Godoy, C. V. (2007) Genetic control of Asian rust in soybean. *Euphytica*, *157*, 15–25.
- Ruddick, J. N. R. (2008). Biocide depletion: chemical, physical, and photo-degradation. (In T. P. Schultz, H. Miltz, M. H. Freeman, B. Goodell & D. D. Nicholas (Eds.), *Development of commercial wood preservatives, efficacy, environmental and health issues* (pp. 285-311). Washington: American Chemical Society).
- Scherm, H., Christiano, R. S. C., Esker P. D., Del Ponte, E. M. & Godoy, C. V. (2009). Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. *Crop Protection*, *28*, 774–782.

- Sharma, N. & Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 587–593.
- Shivashankar, T., Annadurai, R. S., Srinivas, M., Preethi, G., Sharada, T. B., Paramashivappa, R., Srinivasa-Rao, A., Prabhu, K. S., Ramadoss, C. S., Veeresh, G. K. & Subba-Rao, P. V. (2000). Control of coconut black-head caterpillar (*Opsina arenosella* Walker) by systemic application of 'Soluneem': a new water-soluble neem insecticide formulation. *Current Science*, 78, 176-179.
- Silva, A. C., Sales, N. L. P., Araujo, A. V. & Caldeira-Júnior, C. F. (2009). Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 1853-1860.
- Silva, A.C., Souza, P. E., Pinto, J. E. B. P., Silva, B. M., Amaral, D. C. & Carvalho, E. A. (2011). Essential oils for preventative treatment and control of Asian soybean rust. *European Journal of Plant Pathology*, DOI: 10.1007/s10658-010-9646-s.
- Simões, C. M. O. & Spitzer, V. (2000). Óleos voláteis. (In C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmaann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz & P. R. Petrovick (Eds.), *Farmacognosia: Da planta ao medicamento* (pp. 467-495). Porto Alegre: UFRGS).
- Soylu, E. M., Soylu, S., Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161, 119–128.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soylu, E. M. & Kurt, S. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1021–1030.

- Sundaram, K. M. S., Campbell, R., Sloane, L. & Studens, J. (1995). Uptake, translocation, persistence and fate of azadirachtin in aspen plants (*Populus tremuloides* Michx.) and effects on pestiferous two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Crop Protection*, *14*, 415-421.
- Tenuta, A., Hershman, D., Draper, M. & Dorrance, A. (2005). Fungicide basics. (In A. E. Dorrance, M. A. Draper & D. E. Hershman (Eds.), *Using foliar fungicides to manage soybean rust SR-2005* (pp. 22–29). Columbus: Ohio State University).
- Tsuda, M., Itoh, H. & Kato, S. (2004). Evaluation of the systemic activity of simeconazole in comparison with that of other DMI fungicides. *Pest Management Science*, *60*, 875–880.
- Yang, X. B., Royer, M. H., Tschanz, A. T. & Tsai, B. Y. (1990). Analysis and quantification of soybean rust epidemics from 73 sequential planting experiments. *Phytopathology*, *80*, 1421-1427.
- Yang, X. B., Dowler, W. M. & Tschanz, A. T. (1991a). A simulation-model for assessing soybean rust epidemics. *Journal of Phytopathology*, *133*, 187-200.
- Yang, X. B., Tschanz, A. T., Dowler, W. M. & Wang, T. C. (1991b). Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, *81*, 1420-1426.
- Yang, X. B. & Robertson, A. (2005). Making fungicide decisions for managing soybean rust. (In A. E. Dorrance, M. A. Draper & D. E. Hershman (Eds.), *Using foliar fungicides to manage soybean rust SR-2005* (pp. 16–21). Columbus: Ohio State University).



Yorinori, J. T., Paiva, W. M., Frederick, R.D., Costamilan, L. M., Bertagnolli, P. F., Hartman, G. E., Godoy, C. V. & Nunes-Junior, J. (2005). Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, 89, 675-677.

Table 1 Analysis of variance of the area under the disease-progress curve (AUDPC) as a function of experimental parameters

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	Pr (>F)
Block	4	1653	413	0.3776	0.824233 <sup>ns</sup>
Leaf	1	227914	227914	208.194	< 2.2e-16***
Treatments	4	58618	14655	13.3867	6.811e-09***
Between essential oils	2	3541	1771	1.6174	0.203190 <sup>ns</sup>
Essential oil vs fungicide	1	7672	7672	7.0081	0.009328**
All vs negative control	1	47405	47405	43.3038	1.736e-09***
Concentration	3	3080	1027	0.9378	0.425121 <sup>ns</sup>
Leaf : treatment	4	5971	1493	1.3636	0.251412 <sup>ns</sup>
Leaf : concentration	3	2037	679	0.6201	0.603474 <sup>ns</sup>
Treatment : concentration	6	11924	1987	1.8154	0.102723 <sup>ns</sup>
Leaf : treatment : concentration	6	5848	975	0.8904	0.504707 <sup>ns</sup>
Residuals	108	118229	1095		

<sup>ns</sup>not significant; \*\*significant at 1% probability; \*\*\*significant at 0.1% probability (Tukey test)

Table 2 Mean values of the areas under the disease-progress curves (AUDPC) obtained using essential oils as curative and eradicated treatments in the control of Asian soybean rust

Treatment	AUDPC values		
	Mean	Lower	Upper
<i>Aloysia gratissima</i> oil	106.5 <sup>b</sup>	96.1	116.8
<i>Cordia verbenacea</i> oil	100.0 <sup>b</sup>	89.6	110.4
<i>Hyptis marruboides</i> oil	113.3 <sup>b</sup>	102.9	123.7
Fungicide Pyraclostrobin/ epoxiconazole (positive control)	65.9 <sup>a</sup>	45.2	86.7
1% Tween 20 in water (negative control)	168.9 <sup>c</sup>	148.2	189.7

Within a column, values bearing different lower-case superscript letters are significantly different at 5% probability (Tukey test)

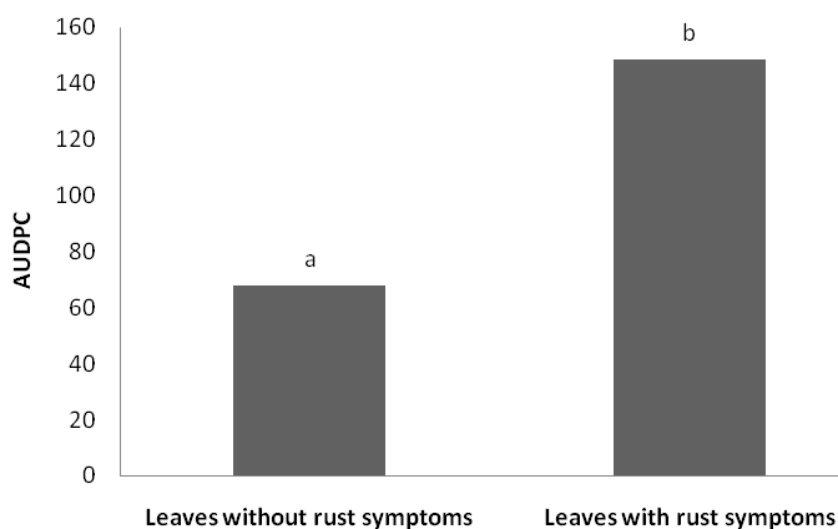


Figure 1 Comparison of the mean values of the areas under the disease-progress curves (AUDPC) of soybean leaves that presented rust symptoms and those that exhibited no symptoms at the first evaluation following treatment with essential oils. Bars labeled with different lower-case letters indicate mean values that are significantly different one from another (Tukey test; 0.1% probability)

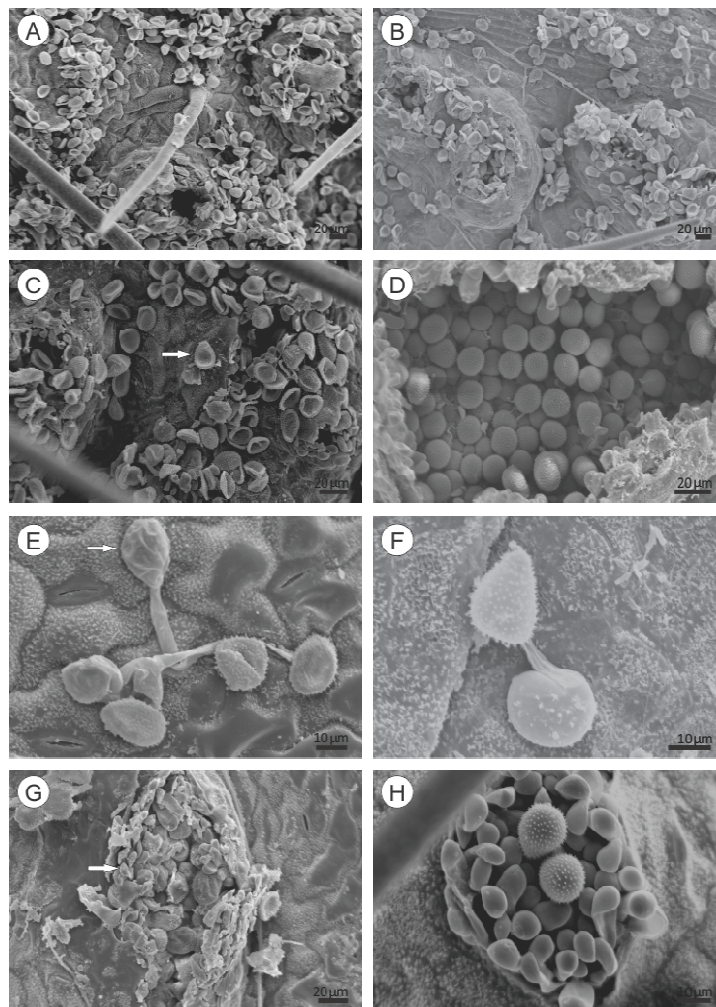


Figure 2 Scanning electron microscopic images of fungal structures on leaves from infected soybean plants that had been treated with 0.05% emulsions (in water containing 1% Tween 20) of essential oils from *Aloysia gratissima* (A), *Cordia verbenacea* (B, E and G) and *Hyptis marrubioides* (C). Arrows indicate shriveled urediniospores (C), appressoria (E) and paraphyses (G). Similar alterations were observed in fungal structures on leaves from infected soybean plants that had been treated with higher concentrations of essential oils or with commercial fungicide, but no morphological changes were detected in the negative controls that had been treated with water containing 1% Tween 20 but no additive (D, F and H)

**ARTIGO 2**

**Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants**

Normas da Revista Científica Plant Pathology (versão preliminar)

**Abstract**

Eucalyptus plants cultivated in greenhouses, nurseries and clonal minigarden are vulnerable to attack by fungal pathogens, mainly *Oidium eucalypti* (powdery mildew). Essential oils and decoctions prepared from the traditional Brazilian medicinal plants *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* have been shown to be effective in the control of some plant diseases. In the present study, the local and systemic effects of these preparations in the control of *O. eucalypti* were evaluated by assessing the progress of the disease in saplings of a highly susceptible hybrid population of eucalyptus (“urocam”). The systemic effects were also assessed by investigating the ability of the preparations to induce disease resistance, as indicated by increased peroxidase activity. The natural products were found to be more effective than a commercial fungicide (pyraclostrobin/epoxyconazole mixture) in the local control of *O. eucalypti* in eucalyptus plants grown in the greenhouse. Additionally, peroxidase activities in *Oidium*-inoculated eucalyptus plants that had been treated with the preparations were significantly ( $P = 0.05$ ) higher than those established in untreated controls. Scanning electron microscopy analysis revealed that the oils and decoctions exhibited direct fungitoxic activities on *O. eucalypti* as shown by lysis of hyphae walls and shrinking of conidia. The results presented herein suggest that oils and decoctions from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* may offer an effective, practical and ecofriendly strategy for the control of *O. eucalypti* in eucalyptus.

**Keywords:** *Oidium eucalypti*, eucalyptus, alternative control, fungitoxic activity, induction of resistance

**Resumo**

Mudas de eucalipto cultivadas em casa de vegetação, viveiros e minijardim clonal são vulneráveis ao ataques de fungos, principalmente *Oidium eucalypti* (oídio). Óleos essenciais e decoctos preparados a partir das tradicionais plantas medicinais brasileiras *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* e *Hyptis marrubioides* têm mostrado eficazes no controle de algumas doenças de plantas. No presente estudo, os efeitos locais e sistêmicos dos óleos essenciais e decoctos no controle de *O. eucalypti* foram avaliados através do progresso da doença em mudas de uma população altamente suscetível do híbrido de eucalipto ("urocam"). Os efeitos sistêmicos também foram avaliadas através da capacidade dos óleos essenciais e decoctos em induzir resistência sistêmica a doenças, como indicado pelo aumento da atividade da peroxidase. Os produtos naturais foram mais eficaz do que o fungicida comercial (piraclostrobina / epoxyconazole) no controle local do *O. eucalypti* em mudas de eucalipto cultivadas em casa de vegetação. Além disso, as atividades de peroxidase em plantas de eucalipto inoculadas com *Oidium eucalypti* foram significativamente ( $P = 0,05$ ) superiores às estabelecidas nos controles não tratados. Análise de microscopia eletrônica de varredura revelou que os óleos e decoctos foram fungitóxicos ao *O. eucalypti* causando lise das paredes hifas e murchamento de conídios. Os resultados apresentados sugerem que os óleos e decoctos de *A. gratissima*, *C. verbenacea* e *H. marrubioides* podem oferecer uma estratégia eficaz no controle do *O. eucalypti* em eucalipto.

*Palavras-chave:* *Oidium eucalypti*, eucalipto, controle alternativo, a atividade fungitóxica, indução de resistência.

## Introduction

Many species of the genus *Eucalyptus* are cultivated as sources of timber, pulpwood, charcoal and essential oil in various parts of the world. The plants are susceptible to a variety of fungal pathogens, including *Oidium eucalypti* (powdery mildew), which mainly attacks saplings grown in greenhouses and nurseries (Dos Santos *et al.*, 2001). Species of *Oidium*, which attack thousands of other angiosperms, produce large amounts of conidia that appear as white powdery spots on all plant parts (leaves, stems, flowers and fruits) causing significant economical losses (Glawe, 2008). It is, therefore, important that appropriate phytosanitary measures be taken to control powdery mildew in eucalyptus nurseries, greenhouses and clonal minigarden.

The most common method of controlling powdery mildew involves the application of synthetic fungicides. Unfortunately, the continued use of such compounds is not only harmful to humans and the environment, but can also lead to the emergence of resistant pathogenic strains (Reimann & Deising, 2000; Dianz *et al.*, 2002). According to Bettiol & Stadnik (2001), resistant strains of *Oidium* spp. may be readily isolated from fungicide-treated plantations, and the use of alternative methods of disease management is recommended in order to minimize or prevent this outcome. In this context, Sharma & Tripathi (2006) have claimed that plant-derived products do not induce resistance with the same facility since they contain a number of constituents with different mechanisms of action. Additionally, Paul & Sharma (2002) state that the active principles in plant extract may not only exert a direct toxic effect on the pathogen but also induce systemic resistance in the host.

Essential oils from the traditional Brazilian medicinal plants *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. (Verbenaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) and *Hyptis marrubioides* Epling ex Hoehne (Lamiaceae) have been shown to be effective in the control of phytopathogens (Silva *et al.*, 2011).



In the present study, we have investigated the local and systemic effects of the essential oils and decoctions derived from these plant species on the control of *O. eucalypti* in a highly susceptible hybrid *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (“urocam”).

## **Materials and methods**

### **Extraction and analysis of essential oils**

Plants of *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* were cultivated in the medicinal garden within the campus at the Universidade Federal de Lavras (UFLA), and voucher specimens were deposited in the herbarium at UFLA with reference numbers 1022, 19810 and 7982, respectively. Aerial parts of the medicinal plants were collected in morning periods during April 2010, and immediately comminuted and transferred to a modified Clevenger apparatus. Essential oil that collected after 2 h of hydrodistillation was separated and stored at - 40°C in aluminium foil-covered glass vials until required for use in the bioassays. The aqueous phase (containing fragments of comminuted plant material) that remained following hydrodistillation was filtered through a 500-mesh sieve, and the decoction so-prepared was stored in the manner described above for essential oils.

Oil samples were subjected to analysis by gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID) using a Shimadzu (Kyoto, Japan) model 17A chromatograph and to GC-mass spectrometry (MS) using a Shimadzu model QP5050A instrument with a quadrupole detector. In each case, a 5% phenyl methylpolysiloxane fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film thickness) was employed. The chromatographic conditions were: oven temperature - initially at 50°C, increased to 200°C at 4°C min<sup>-1</sup>, held at 200°C for 5 min, and finally increased to 280°C at 20°C min<sup>-1</sup>; carrier gas - helium at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>; injector temperature - 220°C; injection

volume - 0.5  $\mu\text{L}$ ; flow ratio - 1:20; interface temperature - 240°C; ionization potential - 70 eV; mass range - 40 - 550  $m/z$ ; scan rate - 0.84 scans  $\text{s}^{-1}$ . The compounds were identified by a comparison of their MS with those of the [National Institute of Standards and Technology \(1998\)](#) on-line library and literature database ([Adams, 2007](#)). Kovats retention indices (KI) were determined from a calibration curve prepared with a series of *n*-alkanes ( $\text{C}_8\text{-C}_{32}$ ) chromatographed under conditions analogous to those of the samples. The retention values were compared with those reported in the literature ([Adams, 2007](#)). The relative concentrations of the essential oil components were calculated by the area normalization method without considering specific response factors.

### **Experimental design**

Saplings of the hybrid *Eucalyptus urophylla*  $\times$  *Eucalyptus camaldulensis* (“urocam”) were acquired from a commercial nursery and maintained in plastic pots under greenhouse conditions until the young plants had produced five pairs of leaves, at which stage they were used in the experiments. The experiment was conducted in duplicate under greenhouse conditions (temperature range: 14.4 to 27.8°C; relative humidity: 72%) in the form of a randomized block design with three repetitions and three plants per plot. The treatments comprised emulsions of essential oil at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0%, decoctions at concentrations of 25, 50 and 75%, or a commercial fungicide (pyraclostrobin/epoxyconazole mixture; Opera®, BASF do Brasil) at a concentration of 0.5  $\text{mL L}^{-1}$ , each in water containing 1% Tween 20. The choice of this fungicide concentration is justified by the fact that it causes phytotoxicity when applied at 1.0  $\text{mL L}^{-1}$  together with mineral oil (2.5  $\text{mL L}^{-1}$ ; Assist®, BASF). Control plants were treated with water containing 1% Tween 20. Treatments were applied every 14 days using a manual atomizer

until runoff. All sections of each of the experimental plants were treated, with the single exception (where appropriate) of the third pairs of leaves, which were protected by plastic bags during each application and for the first 12 h thereafter. In order to allow natural infection by *O. eucalypti* spores, the blocks of treated plants were intercalated with infected eucalyptus plants. Possible local effects were avoided by changing the positions of the plants within the blocks every 2 days such that, at the end of the experimental period, all plants had occupied all locations available.

#### **Evaluation of the local effect of essential oils and decoctions**

The local effects of treatments were assessed every 7 days by examining the second pairs of leaves that had been directly sprayed with plant-derived products or with control solution. In total, eight evaluations were carried out in order to determine the severity of disease, which was assessed using the diagrammatic key proposed by [Alfenas & Zauza \(2007\)](#). The areas under the disease progress curves (AUDPC) were calculated according to the method of [Shaner & Finney \(1977\)](#).

#### **Evaluation of the systemic effect of essential oils and decoctions**

The systemic effects of treatments were assessed by examining the third pairs of leaves that had been covered with plastic bags during spraying and for 12 h thereafter, following which they were exposed to the environment and to fungal spores. The severity of the disease on these untreated leaves was evaluated as described above.

Peroxidase (EC 1.11.1.7) activity, taken as a marker of systemic resistance, was assessed in 70-day-old eucalyptus plants. The experiment was conducted according to a totally randomized design in a growth room at 24°C with a 12 h photoperiod, and involved three replicates per treatment and three

plants were sampled at each collection time. The treatments consisted of *H. marruboides*, *A. gratissima* and *C. verbenacea* essential oils (0.25, 1.0 and 0.25%, respectively) and decoctions (25, 50 and 25%, respectively), each in water containing 1% Tween 20. These concentrations were used because they were shown to be the most effective in the systemic control of *Oidium*. The controls consisted of *Oidium*-inoculated plants that had not been treated with oils/decoctions, and plants treated with water containing 1% Tween 20. Experimental plants were inoculated with *O. eucalypti* on the third day after treatment by application of a conidial suspension in water containing 1% Tween 20 ( $2 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>) that had been prepared with material collected from infected eucalyptus plants, while a control group received no fungal spores at this stage. The first two pairs of leaves were removed from all plants at different times (0, 24, 48, 72 or 96 h) following the application of fungal spores to the experimental plants, and subsequently wrapped in aluminium foil, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until required for assay. Leaf pairs were reduced to a fine powder by maceration with liquid nitrogen in a mortar and pestle, and transferred to a Falcon tube. Sodium acetate buffer (50 mM; pH 5.2) was added to the powder in the proportion of 1: 6 (w/v), the mixture was homogenized under agitation for 10 s and centrifuged at 13000 rpm (radius of rotor 9.5 cm) for 10 min at 4°C. The concentration of protein in the suspension was determined according to the [Bradford \(1976\)](#) method with bovine serum albumin as standard. Peroxidase activity was evaluated using the guaiacol oxidation method in which the enzyme mixture consisted of 30 µL of leaf extract, 100 µL of 19.2 mM phosphate buffer (pH 7.0), 25 µL of 20 mM guaiacol, 25 µL of 60 mM hydrogen peroxide and 20 µL of sterile distilled water. The absorbance of the reaction mixture at 480 nm was measured after 10 min of incubation at 30°C ([Urbanek et al., 1991](#)), and peroxidase activity was expressed in µmol of tetraguaiacol produced per min per mg of protein.

### **Evaluation of the fungitoxic effects of essential oils and decoctions**

Eucalyptus plants presenting the highest levels of disease severity were treated with the concentrations of essential oils and decoctions as described above. *Oidium*-infected leaves were collected 15 h after treatment and submitted to scanning electron microscopy (SEM) (Medice *et al.*, 2007) in order to evaluate the fungitoxic effects of the preparations in terms of the morphological changes observed in fungal hyphae and conidiospores.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA): normality and homogeneity of variance were evaluated by inspection of the residual plots and no deviations from the assumptions were observed. Tukey test (at 5% probability) was applied, where appropriate, in order to determine the significance of the differences between mean values. Quantitative variables were submitted to regression analysis. Peroxidase activity was plotted as a function of time and the standard deviation of the mean was calculated.

## **Results**

### **Compositions of essential oils**

GC-MS analysis revealed a considerable diversity in the complexity and in the proportions of the various chemical classes present in essential oils derived from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* (Table 1). The oil from *A. gratissima* presented the largest number of components (39), followed by *C. verbenacea* oil with 26 and *H. marrubioides* oil with 24 (data not shown).  $\beta$ -Pinene, *trans*-pinocamphone and *trans*-pinocarvyl acetate were the main constituents of *A. gratissima* oil, although these compounds were either

absent or present in minute amounts in the oils of the other two species (Table 2). Methyl (2E,6E)-farnesoate and  $\beta$ -caryophyllene were the major constituents of *C. verbenacea* oil, while the main constituents of the oil of *H. marrubioides* oil were *cis*- and *trans*-thujone, both of which were absent from the other oils.

### Local and systemic effects of treatments

The results of ANOVA indicated that there were no interactions between the main variables of interest when the local effects of oils and decoctions were evaluated. The coefficients of variation in experiments aimed at evaluating the local and systemic effects of essential oils and decoctions were 14.2 and 7.3%, respectively. The global mean values of AUDCP recorded for preparations from all three plants and at all concentrations tested (Fig. 1) revealed that the decoctions were significantly more effective than the essential oils in the local control of *O. eucalypti*, but that both treatments were equally effective in the systemic control of powdery mildew. Considering the three plants individually, there were no differences between the preparations derived from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* in the local control of the fungus, although each was significantly more effective than the commercial fungicide (Fig. 2a). Evaluation of the systemic effects of the treatments revealed that the effectiveness of the preparations derived from *A. gratissima* were significantly greater than those obtained from *C. verbenacea*, in controlling *O. eucalypti* infection, but not significantly different from those exhibited by *H. marrubioides* and the fungicidal mixture (Fig. 2b).

The essential oil (at 1%) and the decoction (at 50 or 75%) from *A. gratissima* were significantly ( $P < 0.05$ ) more effective in the systemic control of *O. eucalypti* than the lower concentrations assayed as shown by the mean values of AUDCP (Table 3). The systemic effects of the oils and decoctions

from *C. verbenacea* and *H. marrubioides* were similar irrespective of the concentrations employed.

### **Fungitoxic effects of treatments**

The SEM micrographs indicated that, even at the lowest concentrations, the essential oils (Figs. 3a – c) and decoctions (Figs. 3d – f) induced degenerative alterations in hyphae, conidiospores and conidia that were more pronounced than those produced by the fungicide mixture (Fig. 3g). The main degenerative alterations observed were lysis of the hyphal walls and shrinking of the conidia and conidiophores. Treatment with water containing 1% Tween 20 (control) induced only minor alterations in the fungal structures (Fig. 3h).

### **Effects of treatments on peroxidase activity**

Peroxidase activities in plants treated with essential oils and decoctions peaked 48 h after inoculation with *O. eucalypti*, and the differences were statistically significant ( $P = 0.05$ ) in comparison with control plants sprayed with water containing 1% Tween 20 (Fig. 4). Similar responses were observed over this period with non-inoculated plants, except for those treated with *A. gratissima* oil in which peroxidase activity increased slightly at 72 and 96 h. It is also possible to observe a slight increase in peroxidase activity at 48 h in inoculated plants treated with 1% Tween 20 (control) in comparison with their non-inoculated counterparts.

### **Discussion**

The present study demonstrated that *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* contain active principles that are not only directly effective against *O. eucalypti* but also induce systemic resistance in eucalyptus plants. Six main chemical classes were present in the essential oils including alcohols,

aldehydes, esters, ethers, hydrocarbons and ketones (Table 1). According to Faid *et al.* (1996), the antimicrobial activities of essential oil constituents decrease in the order: phenols > alcohols > aldehydes > ketones > ethers > hydrocarbons. The majority of the components of the oils of *A. gratissima* and *C. verbenacea* were hydrocarbons (52.91 and 46.55% respectively), whereas *H. marrubioides* oil contained a greater proportion of ketones (63.01%). In spite of these differences in composition, essential oils derived from the three plants were equally efficient in the control of *O. eucalypti*. It is likely that the antifungal activities of the oils are more associated with synergism between the components than with absolute concentrations, as has been suggested by other authors (Romagnoli *et al.*, 2005; Sharma & Tripathi, 2006).

All of the oils and decoctions tested were effective in the local control of powdery mildew on eucalyptus even at the lowest concentrations tested. This result was confirmed by SEM analysis, which showed that similar morphological alterations were induced in *O. eucalypti* structures independent of the concentration of preparation applied. Other researchers have reported that such morphological alterations are concentration-dependent, i.e. the higher the concentration the more intense the alterations observed (Romagnoli *et al.*, 2005; Tolouee *et al.*, 2010). Further verification of these findings will be of considerable importance in determining the appropriate level of application of natural preparations in the field or in nurseries.

Although the oils and decoctions studied were determined to be fungitoxic on the basis of AUDPC values and SEM analysis, the latter were more effective against *O. eucalypti* than the former. It is likely that the protection provided by the essential oils would diminish over time because of volatilization. In this context, Silva *et al.* (2011) observed that the protective effect of essential oils in the control of Asian rust in soybean plants decreased with time, and similar findings were reported by Carneiro *et al.* (2007) with



respect to the effectiveness of neem oil in preventing *Oidium* infection in bean plants. It has been suggested that the reduced effectiveness of essential oils over time may also be attributed to degradation induced by oxygen, light or temperature (Ruddick, 2008).

Deformations, in the form of collapsed and shattered hyphae and conidiospores and shrunken conidia, observed in the SEM micrographs recorded in the present study, were clearly produced by the essential oils and decoctions applied since the controls only caused minor changes in the morphology of the fungus. Alterations in the morphology of hyphae and conidia induced by essential oils and other plant extracts have been observed in several fungal species (Fiori *et al.*, 2000; Soylu *et al.*, 2007; Medice *et al.*, 2007), and result from various factors including cytoplasm leakage, inhibition of enzyme reactions associated with cell wall biosynthesis (Sharma & Tripathi, 2006), increased permeability of cell membranes caused by the lipophilic nature of essential oils (Ultee *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 2001; Soylu *et al.*, 2007), and direct cytotoxicity resulting from cell uptake (Inouye *et al.*, 2000; Edris & Farrag, 2003). No resistance or adaptation of fungal spores or mycelia towards plant-derived products has been reported so far, probably because of the multiple mechanisms of action of the diverse constituents (Bakkali *et al.*, 2008).

Evaluation of the systemic effects of the natural preparations revealed that higher concentrations of the essential oil (at 1% level) or the decoction (at 50 or 75% levels) derived from *A. gratissima* were most efficient in the control of *O. eucalypti* infection. This finding is in agreement with that of Devaiah *et al.* (2009), who observed that greater systemic protection of millet plants against *Sclerospora graminicola* could be obtained by treating seeds with extracts of *Datura metel* at a concentration of 2% in comparison with treatment at the 1% level. However, while the oils and decoctions from *C. verbenacea* and *H. marruboides* showed similar systemic effects to those obtained with lower

concentrations of preparations from *A. gratissima*, all induced comparable enhancements of peroxidase activity in *Oidium*-infected plants. Indeed, even plants that had not been infected with *O. eucalypti* showed increases in peroxidase activity following treatment with the essential oils or decoctions, indicating that such plants could readily respond to an eventual attack by pathogens. Peroxidase activity is a valuable and commonly used marker for estimating acquired systemic resistance in plants (Rasmussen *et al.*, 1995). It is known that peroxidases are involved in numerous cellular processes including the final steps of lignin and suberin biosynthesis (Whetten *et al.*, 1998), and the metabolism of phenylpropanoids (Vidhyasekaran *et al.*, 1997). In addition, peroxidases are involved in the oxidation of phenols into compounds that are toxic to pathogens (Montealegre *et al.*, 2010) and the formation of papillae that can block fungal ingress (Godard *et al.*, 2009). Within this context, the induction of resistance, either as a single strategy or in combination with others, is a valuable approach in disease management because it minimizes the application of synthetic fungicides and contributes to environmental preservation.

An important finding in the present study is that, while the essential oils and decoctions applied directly to leaves (local effect) were more efficient in the control of *O. eucalypti* than the commercial fungicide, leaves that had been covered by plastic bags during the application of these preparations (systemic effect) acquired a degree of protection comparable to that provided by the systemic fungicide. This finding demonstrates that plant-derived products can display an efficiency that is similar to, or greater than, that of synthetic substances with respect to the control of fungal diseases.

There is ample evidence relating to the positive effects of plant-derived products on the control of phytopathogens, but relatively few studies have focused on the *Oidium versus eucalyptus* pathosystem. Bizi *et al.* (2008) tested various products, including salts, tannins, plant oils, plant extracts, fungal

antagonists, and fresh cow's milk and its derivatives, in this system and compared the results with those obtained with the fungicidal mixture pyraclostrobin/epoxyconazole. Apparently, cow's milk and fungal antagonists of the genus *Lecanicillium* were quite efficient in controlling *Oidium*, while essential oils from *Pinus* spp., *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus globulus* (at 1%) and extracts from *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, *Ginkgo biloba*, *E. globulus*, *C. citriodora* and hybrid *Mentha x villosa* were ineffective against the fungus.

Reports concerning the antifungal properties of the essential oils and decoctions from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* are limited. While, [Silva et al. \(2011\)](#) observed that the preparations derived from these plant species were very effective against Asian soybean rust, no information is available concerning the effects of these products on *Oidium* and on the induction of resistance to fungal infection.

The examples presented herein demonstrate that plant-derived products can be used for controlling phytopathogens, but their effectiveness depends on the species, source material, methods of extraction and concentrations applied. Hence, it is important to continue with studies that evaluate the properties of plant natural products, not only with respect to their direct fungitoxic activities but also to their ability to elicit a defence response against pathogens ([Copping & Duke, 2007](#); [Gindro et al., 2007](#)). Currently, the application of natural products is gaining strength in disease management ([Akila et al., 2011](#)), mainly because the preparations are biodegradable and less harmful to humans and animals ([Jayaraj et al., 2008](#); [Devaiah et al., 2009](#)).

In conclusion, the essential oils and decoctions from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* have been found to be more effective than the fungicidal mixture (pyraclostrobin/epoxyconazole) in the local control of *Oidium* sp. in eucalyptus saplings grown in the greenhouse. Moreover, the

natural preparations were as effective as the fungicide in the systemic control of the disease through elicitation of a defence response. The oils also exhibited a direct fungitoxic activity on the hyphae and conidia of *O. eucalypti*. The results presented herein suggest that oils and decoctions from *A. gratissima*, *C. verbenacea* and *H. marrubioides* may offer an effective, practical and ecofriendly strategy for the control of *O. eucalypti* in eucalyptus.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship awarded to one of the authors (ACS); the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the research grant. The authors are grateful for the assistance provided by the Laboratório de Microscopia Eletrônica at UFLA.

### **References**

- Adams RP, 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Akila R, Rajendran L, Harish S, Saveetha K, Raguchander T, Samiyappan R, 2011. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control* **57**, 175–83.
- Alfenas AC, Zauza EAV, 2007. *Doenças na Cultura do Eucalipto*. Viçosa, Brazil: Sociedade de Investigações Florestais.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446–75.

- Bettiol W, Stadnik MJ, 2001. Controle alternativo de oídios. In: Stadnik MJ, Rivera MC, eds. *Oídios*. Jaguariúna, Brazil: Embrapa Meio Ambiente.
- Bizi RM, Grigoletti-Junior A, Auer CG, May-de Mio LL, 2008. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. *Summa Phytopathologica* **34**, 144-8.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Carneiro SMTPG, Pignoni E, Vasconcellos MEC, Gomes JC, 2007. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. *Summa Phytopathologica* **33**, 34-9.
- Copping LG, Duke CO, 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* **63**, 524-54.
- Devaiah SP, Mahadevappa GH, Shetty HS, 2009. Induction of systemic resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) against downy mildew (*Sclerospora graminicola*) by *Datura metel* extract. *Crop Protection* **28**, 783-91.
- Dianz F, Santos M, Blanco R, Tello JC, 2002. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). *Phytoparasitica* **30**, 529-34.
- Dos Santos AF, Auer CG, Grigoletti-Junior A, 2001. *Doenças do Eucalipto no Sul do Brasil: Identificação e Controle*. Colombo, Brazil: Embrapa Florestas (Circular Técnica 45).
- Edris AE, Farrag ES, 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase. *Nahrung* **47**, 117-21.

- Faid M, Charai M, Mosaddak M, 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research* **8**, 657–64.
- Fiori ACG, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Vida JB, Scapim CA, Cruz MES, Pascholati SF, 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology* **148**, 483–7.
- Gindro K, Godard S, De Groote I, Viret O, 2007. Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne? Une nouvelle méthode pour évaluer le potentiel des éliciteurs. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* **39**, 377–83.
- Glawe DA, 2008. The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* **46**, 27-51.
- Godard S, Slacanin I, Viret O, Gindro K, 2009. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 827–37.
- Inouye S, Tsuruoka T, Watanabe M, Takeo K, Akao M, Nishiyama Y, Yamaguchi H, 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* **43**, 17–23.
- Jayaraj J, Wan A, Rahman M, Punja ZK, 2008. Seaweed extract reduces foliar diseases on carrot. *Crop Protection* **27**, 1360–6.
- Medice R, Alves E, Assis RT, Magno-Júnior RG, Lopes EAGL, 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia* **31**, 83-90.

- Montealegre JR, López C, Stadnik MJ, Henríquez JL, Herrera R, Polanco R, Di Piero RM, Pérez LM, 2010. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. *Tropical Plant Pathology* **35**, 271-6.
- National Institute of Standards and Technology, 1998. *PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database*. Gaithersburg, MD: U.S. Department of Commerce.
- Paul PK, Sharma PD, 2002. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiology and Molecular Plant Pathology* **61**, 3–13.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M, 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**, 2635–42.
- Rasmussen CB, Dunford HB, Welinder KG, 1995. Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol. *Biochemistry* **34**, 4022–9.
- Reimann S, Deising HB, 2000. Fungicides: risk of resistance development and search for new targets. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **33**, 329–49.
- Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D, 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* **225**, 57–65.
- Ruddick JNR, 2008. Biocide depletion: chemical, physical, and photo-degradation. In: Schultz TP, Militz H, Freeman MH, Goodell B, Nicholas DD, eds. *Development of Commercial Wood Preservatives, Efficacy, Environmental and Health Issues*. Washington, USA: American Chemical Society, 285-311.
- Shaner G, Finney RF, 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* **67**, 1051-6.

- Sharma N, Tripathi A, 2006. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**, 587–93.
- Silva AC, Souza PE, Pinto JEBP, Silva BM, Amaral DC, Carvalho EA, 2011. Essential oils for preventative treatment and control of Asian soybean rust. *European Journal of Plant Pathology*, *in press*, DOI: 10.1007/s10658-010-9646-5.
- Soylu S, Yigitbas H, Soyly EM, Kurt S, 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1021–30.
- Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Zad SJ, Jaimand K, Taeb J, Rezaee MB, Kawachi M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M, 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* **139**, 127–33.
- Ultee A, Kets EPW, Smid EJ, 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4606–10.
- Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka H, 1991. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum* **13**, 43-50.
- Vidhyasekaran P, Ponmalar TR, Samiyappan R, Velazhahan R, Vimala R, Ramanathan A, 1997. Host specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology* **87**, 1258–63.
- Whetten RW, MacKay JJ, Sederoff RR, 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 585–609.



Table 1 Relative percentages of the main chemical classes present in the essential oils derived from *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* as determined by GC-MS analysis

Class of compounds	Composition (%)		
	<i>A. gratissima</i>	<i>C. verbenacea</i>	<i>H. marrubioides</i>
Alcohols	15.95	2.2	7.34
Aldehydes	1.94	0.31	- <sup>a</sup>
Esters	9.4	36.36	-
Ethers	1.87	6.36	2.17
Hydrocarbons	52.91	46.55	24.59
Ketones	16.92	4.07	63.01

<sup>a</sup> Not detected

Table 2 Relative percentages of the main constituents (shown in bold) of the essential oils derived from *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* as determined by GC/MS analysis

Retention index	Compound	Relative area (%)		
		<i>A. gratissima</i>	<i>C. verbenacea</i>	<i>H. marrubioides</i>
970	Sabinene	1.07	0.81	<b>9.62</b>
975	$\beta$ -Pinene	<b>27.05</b>	- <sup>a</sup>	1.01
988	Myrcene	<b>3.82</b>	-	-
1028	Limonene	3.67	<b>3.59</b>	-
1106	<i>cis</i> -Thujone	-	-	<b>43.49</b>
1117	<i>trans</i> -Thujone	-	-	<b>15.18</b>
1160	<i>trans</i> -Pinocamphone	<b>11.93</b>	-	-
1175	<i>cis</i> -Pinocamphone	<b>3.95</b>	-	<b>4.34</b>
1294	<i>trans</i> -Pinocarvyl acetate	<b>8.94</b>	-	-
1374	$\alpha$ -Copaene	-	0.29	<b>3.48</b>
1418	$\beta$ -Caryophyllene	2.81	<b>26.2</b>	<b>5.07</b>
1454	$\alpha$ -Humulene	0.82	<b>7.60</b>	0.39
1493	Bicyclogermacrene	1.97	<b>2.99</b>	-
1580	Caryophyllene oxide	1.87	<b>3.01</b>	2.17
1595	Guaiol	<b>6.23</b>	-	-
1778	Methyl (2E,6E)-farnesoate	-	<b>35.85</b>	-

<sup>a</sup> Not detected

Table 3 Systemic effects of different concentrations of essential oils and decoctions derived from *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* on the control of *Oidium eucalypti* in eucalyptus saplings, as represented by areas under the disease progress curves (AUDPC)

Treatment	AUDPC (mean values)		
	<i>A. gratissima</i>	<i>C. verbenacea</i>	<i>H. marrubioides</i>
Essential oils			
0.25%	2530.5 <sup>a</sup>	2338.5 <sup>a</sup>	2431.2 <sup>a</sup>
0.5%	2459.2 <sup>a</sup>	2396.0 <sup>a</sup>	2410.4 <sup>a</sup>
1.0%	2064.7 <sup>b</sup>	2387.6 <sup>a</sup>	2295.3 <sup>a</sup>
Decoctions			
25%	2499.0 <sup>a</sup>	2510.5 <sup>a</sup>	2389.9 <sup>a</sup>
50%	2062.6 <sup>b</sup>	2349.6 <sup>a</sup>	2373.4 <sup>a</sup>
75%	2007.6 <sup>b</sup>	2492.6 <sup>a</sup>	2537.0 <sup>a</sup>

Within each group (essential oil and decoction), mean values within the same column followed by dissimilar lower case superscript letters are significantly different according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). The AUDPC mean value ( $\pm$  standard error) of the fungicide mixture (positive control) was  $2384.4 \pm 100.04$ , while that of the 1% Tween 20 in water (negative control) was  $2554.6 \pm 100.04$ .

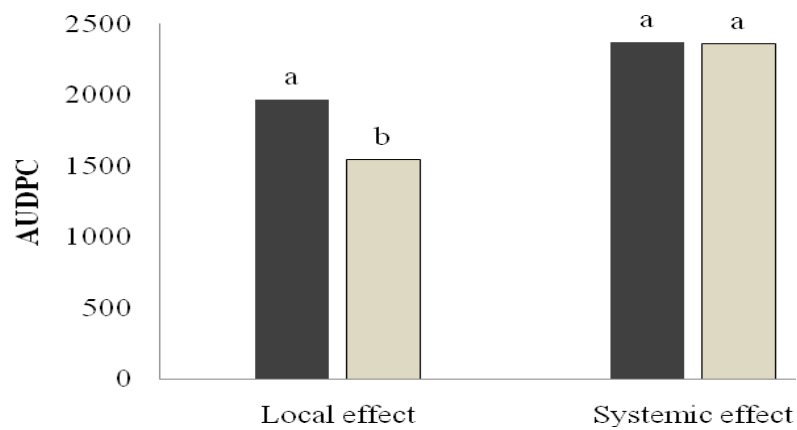


Figure 1 Local and systemic effects of essential oils (■) and decoctions (■) from *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* as represented by mean values of areas under the disease progress curves (AUDPC). Bars bearing dissimilar lower case letters are significantly different according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ )

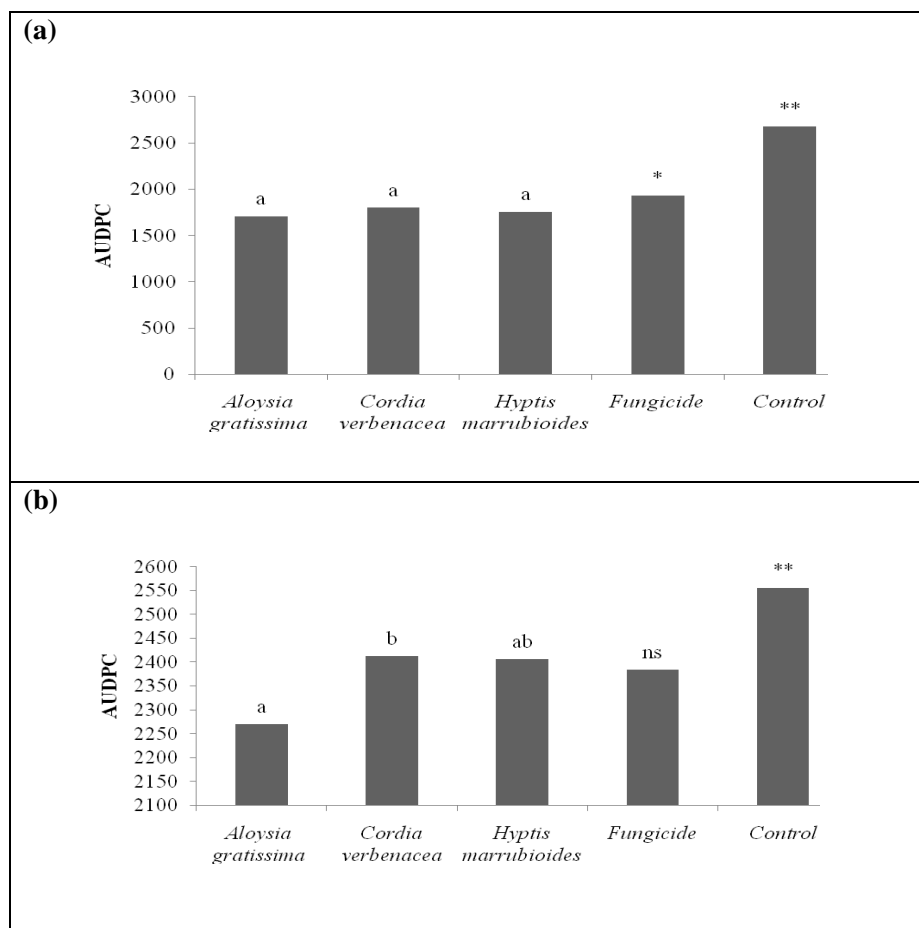


Figure 2 Local **(a)** and systemic **(b)** effects of essential oils and decoctions from *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* in comparison with those of the fungicidal mixture pyraclostrobin/epoxyconazole and the negative control (water containing 1% Tween 20) as represented by areas under the disease progress curves (AUDPC). Bars bearing dissimilar lower case letters are significantly different according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Bars bearing \* indicate significant difference in relation to the combined mean values of essential oils and decoctions, those bearing \*\* indicate significant difference in relation to the combined mean values of essential oils and decoctions and to the fungicide mixture, and those bearing ns indicate non-significant differences in relation to the combined mean values of essential oils and decoctions ( $F$  test;  $P \leq 0.05$ )

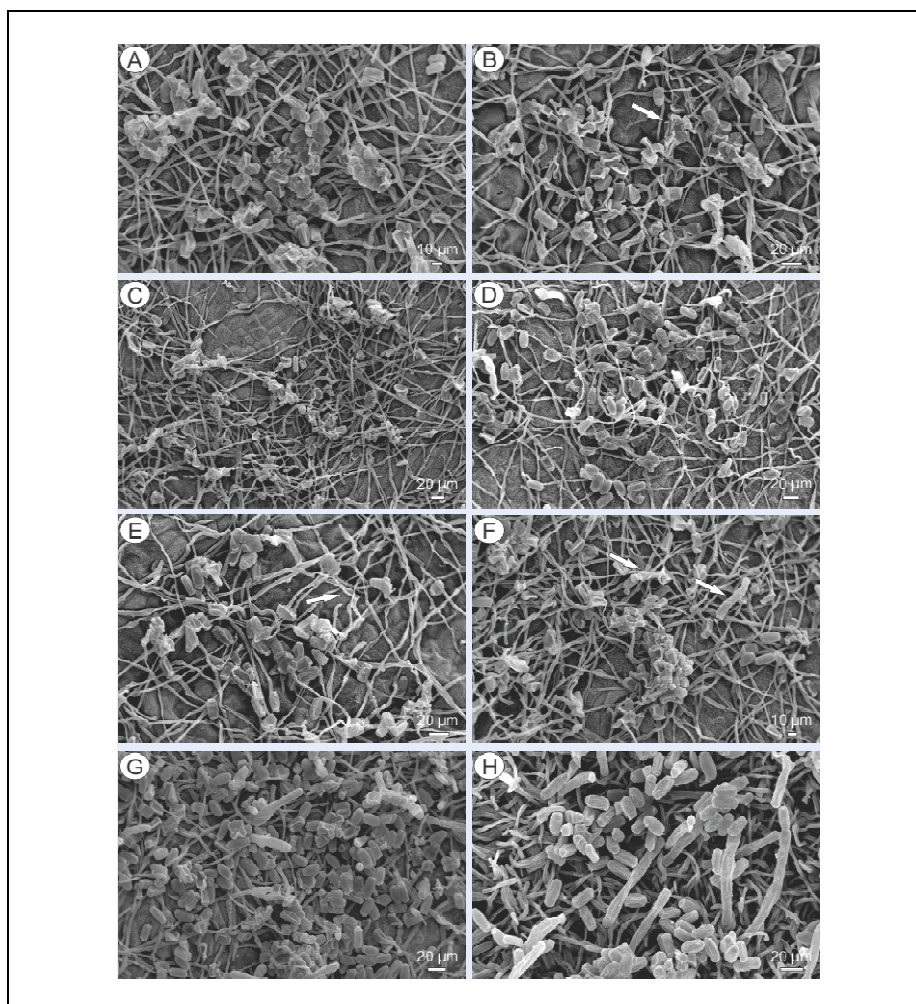


Figure 3 Scanning electron micrographs from *Oidium*-infected eucalyptus leaves treated with *Aloysia gratissima*, *Cordia verbenacea* and *Hyptis marrubioides* essential oils (**a**, **b** and **c**, respectively) and decoctions (**d**, **e** and **f**, respectively). The fungicidal mixture pyraclostrobin/epoxyconazole was used as positive control (**g**), and water containing 1% Tween 20 was used as negative control (**h**). White arrows indicate the morphological alterations observed in the conidia (**b**), and shrunken and lysed hyphal walls (**e**) and conidiospores (**f**). Since the alterations observed at all concentrations were similar, the images shown are from eucalyptus leaves

treated with the lowest concentrations of essential oils and decoctions (0.25 and 25%, respectively)

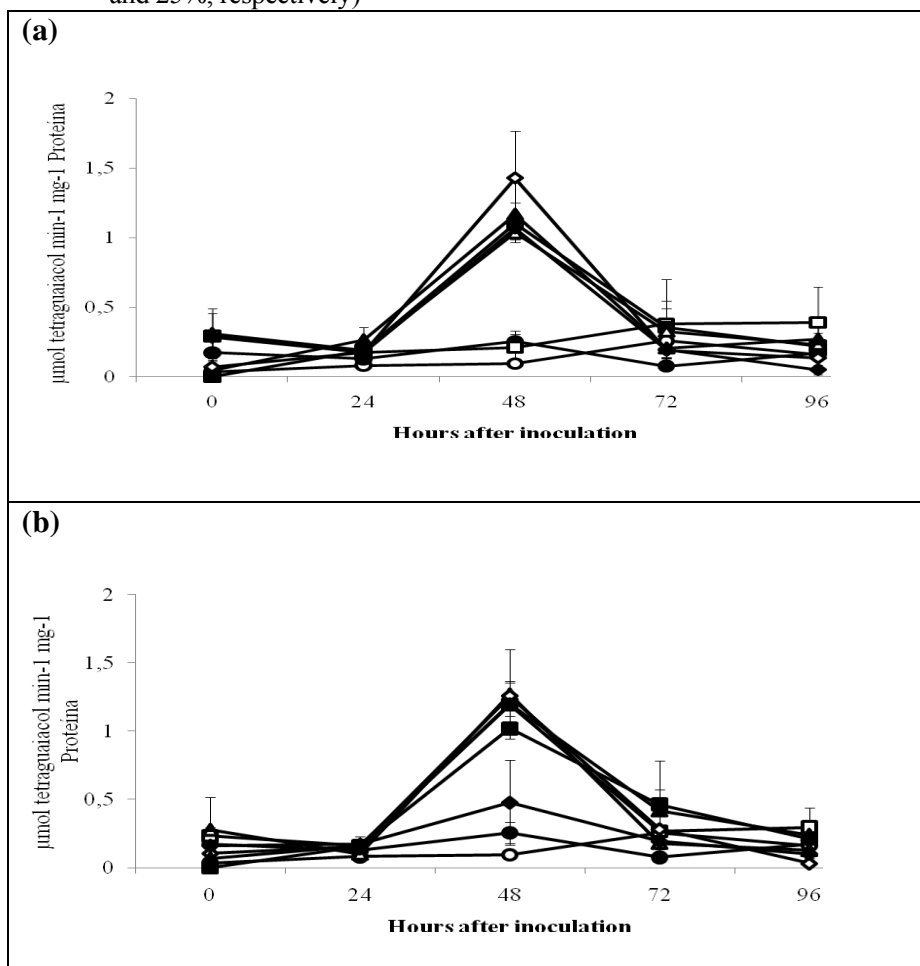


Figure 4 Peroxidase activities in eucalyptus leaves following treatment of plants with essential oils (a) and decoctions (b) from *Aloysia gratissima* (■, □), *Cordia verbenacea* (▲, Δ) and *Hyptis marrubioides* (◆, ◇). The controls were plants treated with water containing 1% Tween 20 (●, ○). *Oidium*-inoculated plants are represented by closed symbols, while plants that received no fungal spores are represented by open symbols

**ARTIGO 3**

**Extrato de folha de cafeeiro e fosfitos no controle do oídio em minicepas de eucalipto**

**Resumo**

Este trabalho teve por objetivos avaliar o extrato vegetal de folha de cafeeiro (NEFID), diferentes formulações de fosfitos e a combinação entre o extrato e os fosfitos no controle do oídio em minicepas de eucalipto, bem como estudar o efeito sobre a produção e a porcentagem de enraizamento de miniestacas. Os experimentos foram conduzidos em jardim clonal e em casa de vegetação, em dois híbridos de eucalipto (“urocam” e “urograndis”). Preliminarmente, foi avaliada a capacidade do extrato vegetal NEFID e dos fosfitos de cobre, zinco, potássio e potássio/manganês no controle do oídio e a ação fungitóxica direta sobre a morfologia do fungo. Posteriormente, foi analisada a fungitoxicidade direta, curativa, antiesporulante da mistura entre o extrato NEFID e os fosfitos e seu efeito na produção de brotos e no enraizamento das miniestacas de eucalipto. O extrato vegetal NEFID e os fosfitos de Cu, Zn e K/Mn foram mais eficientes que o fungicida piraclostrobina + epoxiconazole no controle do oídio. O fosfito de K não foi eficiente no controle do patógeno. Entre as misturas, a que continha 50% do extrato vegetal NEFID com 50% de fosfito de cobre foi a mais eficaz, por apresentar toxicidade direta sobre o oídio, alta eficiência curativa, ação antiesporulante e por não interferir negativamente na produção de brotos e no enraizamento das miniestacas de eucalipto.

**Palavras-chave:** Controle alternativo. produção de brotos. Enraizamento. produção de conídio. Microscopia eletrônica de varredura.



**Abstract**

This study aimed at evaluating the extract from coffee leaves (NEFID), different formulations of phosphites and the combination of the extract and phosphites in order to control powdery mildew in mini-stumps of eucalyptus. I also aimed at studying the effect on the production and rooting percentage of mini-cuttings. The experiments were conducted in a cloned garden and in a greenhouse on two hybrids of eucalyptus (“urocam” e “urograndis”). First, it was evaluated the ability of the plant extract NEFID and the phosphites of copper, zinc, potassium and potassium / manganese in controlling powdery mildew and its toxic effect on the fungi morphology. Subsequently, we analyzed the direct fungi toxicity, curative efficiency, anti-sporulating action of the mixture between the extract NEFID and phosphites and its effect on production of shoots and rooting of mini-cuttings of eucalyptus. The plant extract NEFID and phosphites of Cu, Zn and K / Mn were more effective than the fungicide pyraclostrobin + epoxiconazol in the control of powdery mildew. The potassium phosphite was not effective in controlling the pathogen. Among the mixtures, the one, which contained 50% of the plant extract NEFID with 50% copper phosphite, was the most effective, for its direct fungi-toxicity against pathogen *Oidium eucalypti*, high curative activity, and anti-sporulating action and for not having an adverse effect on the production of shoots and on roots of the eucalyptus mini-cuttings.

**Keywords:** alternative control. production of shoots. roots. production of conidia. scanning electron microscopy.

## INTRODUÇÃO

O eucalipto apresenta-se como uma cultura de grande importância mundial, pela sua produção de madeira para diversos fins, na indústria de papel e celulose, produção de carvão vegetal, óleos para indústrias farmacêuticas, entre outros.

Entre os principais fatores que podem limitar o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção da eucaliptocultura destacam-se as doenças que podem afetar desde o minijardim clonal até as plantas adultas no campo. Na fase de minijardim clonal, o oídio é uma das principais doenças (KRUGNER; AUER, 2005), podendo causar perdas significantes quando não controlado prontamente (BROWN; FERREIRA, 2000).

Oídio do eucalipto requer diversas medidas conjuntas para o seu controle. Quando a doença já está instalada, o uso de fungicidas é, até o momento, o principal método de controle. A utilização de fungicidas, principalmente os sistêmicos, apresenta algumas restrições, tais como o risco de seleção de populações resistentes do patógeno (COOLS; FRAAIJE, 2008; MAVROEIDI; SHAW, 2006) e o seu alto custo. No caso dos oídios, são facilmente selecionados isolados resistentes a fungicidas (BETTIOL; STADNIK, 2001).

Atualmente, o processo produtivo agrícola sofre pressão da sociedade pela redução do uso de pesticidas por causarem efeitos adversos ao homem e ao meio ambiente. Por estas razões, existe uma busca contínua por alternativas que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças.

Extratos vegetais e fosfitos podem ser uma alternativa aos fungicidas sintéticos no controle do oídio em eucalipto. O extrato de folhas de caféiro infectadas por *Hemileia vastatrix* (NEFID) vem apresentando resultados promissores no controle de fitopatógenos e na indução de mecanismos de defesa, principalmente na cultura do caféiro no controle *Hemileia vastatrix*,

*Cercospora coffeicola*, *Phoma tarda* e *Phoma costarricensis* (BARGUIL et al., 2005; SANTOS et al., 2007) e em tomateiro no controle de *Xanthomonas vesicatoria* (MEDEIROS et al., 2009). Já os fosfitos também têm ganhado importância no controle de doenças, principalmente aquelas causadas por oomicetos (REBOLLAR-ALVITER; MADDEN; ELLIS, 2007; RIZZO; GARBELOTTO; HANSEN, 2005; SILVA et al., 2011). No entanto, o efeito de fosfito contra outros patógenos não é bem conhecido (LOVATT; MIKKELSEN, 2006). Os fosfitos podem atuar diretamente, inibindo o desenvolvimento dos fungos e, também, indiretamente, ativando o sistema de defesa da planta hospedeira (JACKSON et al., 2000; SPEISER et al., 1999).

Com isso, esse trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade do extrato NEFID e as diferentes formulações de fosfitos no controle do oídio do eucalipto. Avaliar a ação fungitóxica, antiesporulante e curativa das combinações do extrato NEFID com os fosfitos sobre o oídio do eucalipto, bem como estudar o efeito sobre a produção e porcentagem de enraizamento de miniestacas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do extrato vegetal NEFID**

O extrato vegetal NEFID foi obtido através de folhas de caféiro infectadas por *Hemileia vastatrix* que foram moídas e, então, adicionado em água na concentração de 10%, correspondendo a Brix 1,5. O extrato foi fervido durante 2 h, filtrado em uma peneira de 500 mesh e armazenado a -40 °C até o emprego nos ensaios.

### **Extrato vegetal (NEFID) e fosfitos no controle do oídio, em minicepas de eucalipto em casa de vegetação**

O experimento foi realizado em casa de vegetação com alto potencial de inóculo, para a qual foram adquiridas, de viveiro comercial, minicepas do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (“urograndis”) acesita-144 considerado suscetível ao oídio, tendo sido mantidas nesse local. As minicepas contendo mais de 95% das folhas infectadas foram pulverizadas com os tratamentos a cada 14 dias. Os tratamentos consistiram dos Fosfitos de Zinco (34% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 10% Zn), de Potássio (26% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 19% K<sub>2</sub>O), Potássio/Manganês (57% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 21,3% K<sub>2</sub>O + 5,5% Mn) e de Cobre (20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 4% Cu) na dosagem de 3 mL/L, do fungicida comercial à base de piraclostrobina + epoxiconazole a 0,5 mL/L e do extrato vegetal NEFID a 10%, mais o tratamento controle à base de água. Em todos os tratamentos, foram adicionados KCl a 0,1% e o óleo mineral (Assist<sup>®</sup>) a 2,5 mL/L. As avaliações da severidade da doença foram feitas a cada 7 dias, num total de 7 avaliações, utilizando a escala diagramática proposta por Lima, Lopes e Café Filho (2004). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada de acordo com Shaner e Finney (1977). O experimento foi montado em blocos casualizados, com três repetições, sendo cada parcela constituída de três plantas. Os blocos foram intercalados com linhas de mudas de eucalipto infectadas. Para eliminar um possível efeito de local, a cada dois dias, cada muda foi transferida de lugar, de modo que, ao final do experimento, todas tivessem passado pelos mesmos locais.

### **Extrato vegetal NEFID, combinado ou não com fosfito no controle do oídio, em minijardim clonal de eucalipto**

A fim de avaliar a eficiência da mistura entre o extrato vegetal NEFID com fosfito, foram realizados dois ensaios. No primeiro, os clones do híbrido

*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (“urocam”) VM1, em minijardim clonal foram pulverizados com os tratamentos descritos na Tabela 1 a cada 7 dias. No segundo, foram utilizados os mesmos tratamentos, mas pulverizados a cada 14 dias. Os tratamentos foram aplicados quando mais de 95% das folhas dos clones estavam infectadas. A parcela experimental foi constituída de 1 x 0,5 m, sendo considerada a parcela útil as 10 plantas centrais. O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados, com 3 repetições. A aplicação dos tratamentos foi realizada na parte da manhã, utilizando-se um pulverizador manual até o ponto de escoamento. As avaliações da severidade do oídio foram realizadas a cada 7 dias, utilizando-se a escala diagramática proposta por Lima, Lopes e Café Filho (2004). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada de acordo com Shaner e Finney (1977).

Tabela 1 Formulações à base de extrato vegetal NEFID mais fosfito utilizados no controle do oídio em minijardim clonal de eucalipto

<b>Tratamentos</b>
1-NEFID
2-NEFID 25% +75% Fosfito K
3-NEFID 50% + 50% Fosfito K
4-NEFID 25% +75% Fosfito Zn
5-NEFID 50% + 50% Fosfito Zn
6-NEFID 25% + 75% Fosfito K/Mn
7-NEFID 50% + 50% Fosfito K/Mn
8-NEFID 25% + 75% Fosfito Cu
9-NEFID 50% + 50% Fosfito Cu
10-Fungicida (piraclostrobina + epoxiconazole)
11-Controle (água)
12-Controle (sem tratamento)

Em todos os tratamentos, foram utilizados o óleo mineral Assist (2,5 mL/L) e KCl (0,1%), exceto para a testemunha sem tratamento. A solução estoque dos fosfitos foi preparada na concentração de 4 mL/L e do extrato vegetal NEFID a 10%. A dosagem do fungicida foi de 0,5 mL/L.

#### **Avaliação da produção de conídios**

Na última avaliação da severidade do oídio nas minicepas de eucalipto tratadas a cada 14 dias (Tabela 1), foi avaliada a esporulação (número de conídios/cm<sup>2</sup> de folha) do patógeno. Foram coletadas 6 folhas das plantas de cada parcela que apresentavam maior severidade do oídio. As folhas foram destacadas e colocadas em frasco de vidro contendo 60 mL da solução água mais tween 20 a 1%. Posteriormente, os frascos foram agitados em agitador magnético (TE-140 TECNAL) por 15 min a 150 rpm. Logo após, os frascos

foram colocados em aparelho de ultrassom (Ultrasonic cleaner 1440D odontobrás) durante 10 min. A produção de conídios foi avaliada em câmara de Neubauer. A área foliar foi determinada através do medidor de área foliar Laser Area Meter CI-203 CID, Inc.USA.

### **Produção média e porcentagem de enraizamento de miniestacas**

No ensaio descrito anteriormente, quando os tratamentos foram aplicados a cada 7 dias, foram analisadas a produção média e a porcentagem de enraizamento das miniestacas. As miniestacas foram coletadas seis dias após a segunda aplicação dos tratamentos e três dias após a última coleta.

### **Ação fungitóxica direta dos tratamentos sobre o oídio do eucalipto**

Através da microscopia eletrônica de varredura, foi avaliado o efeito direto dos tratamentos sobre o oídio do eucalipto. Dezesete horas após a aplicação dos tratamentos, foram coletadas folhas infectadas com o patógeno. O preparo e a análise das amostras seguiu a metodologia descrita por Medice et al. (2007).

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e outros procedimentos de inferência estatística. Os valores médios, quando significativos, foram separados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R Development Core Team (2009). A avaliação da normalidade e homogeneidade foi realizada com os resíduos de onde não se verificou desvios das pressuposições envolvidas na análise.

## RESULTADOS

### Extrato vegetal NEFID e fosfitos no controle do oídio em minicepas de eucalipto, em casa de vegetação

O extrato vegetal NEFID apresentou a maior eficiência de controle do oídio em minicepas de eucalipto Acesita-144 (Figura 1). Os fosfitos de potássio/manganês (K/Mn), de zinco (Zn) e de cobre (Cu) também proporcionaram controle eficiente, diferentemente do observado para o fosfito de potássio (K) que não diferiu do tratamento controle. O NEFID e os fosfitos de K/Mn, de Zn e de Cu foram mais eficientes no controle do oídio que o fungicida à base de piraclostrobina + epoxiconazole.

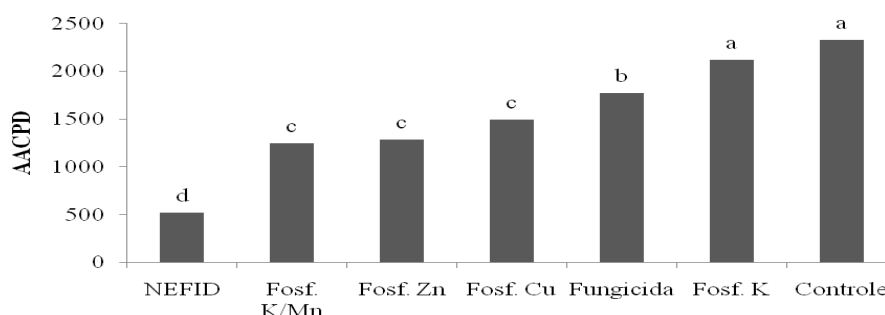


Figura 1 Valores médios da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) obtidos com o uso do extrato de folha de café NEFID e fosfitos no controle do oídio, em casa de vegetação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott com 5% de probabilidade

### Extrato vegetal NEFID combinado ou não com fosfito, no controle do oídio em jardim clonal de eucalipto

Todos os tratamentos foram eficientes no controle do oídio em minicepas de eucalipto (Figura 2). Observa-se que os tratamentos, quando aplicados no intervalo de 7 dias, não diferiram em relação ao controle do



progresso do oídio em minicepas do híbrido “urocam” VM1, em jardim clonal. Já no intervalo de 14 dias, a mistura de 50% do extrato vegetal NEFID com 50% de fosfito de Cu ou com 50% de fosfito de K/Mn foram os tratamentos que obtiveram maior controle da doença. O extrato vegetal NEFID puro e a mistura de 25% do extrato com 75% de fosfito de Cu também se destacaram no controle da doença. Já os outros tratamentos apresentaram um controle igual ao fungicida à base de piraclostrobina + epoxiconazole.

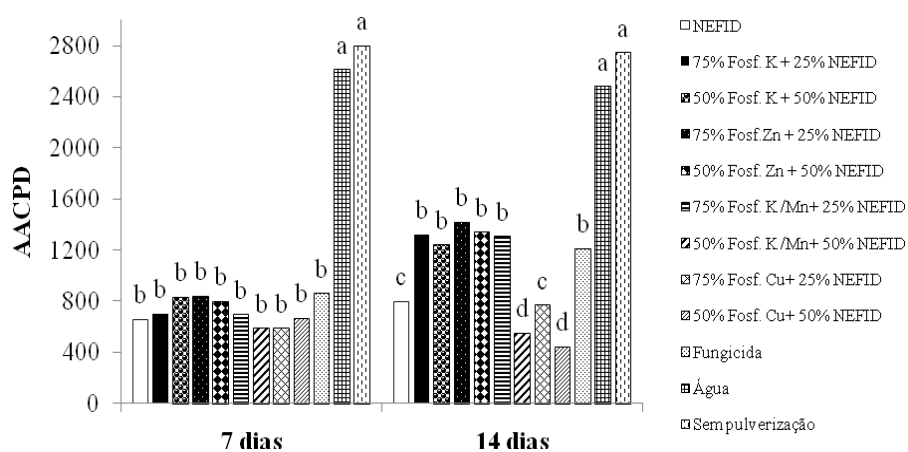


Figura 2 Valores médios da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), com o uso de extrato de folha de café NEFID, misturado ou não com fosfito, pulverizados a cada 7 ou 14 dias, no controle do oídio, em minicepas do híbrido “urocam VM1”. Colunas com mesma letra, no mesmo intervalo de pulverização, não diferem pelo teste Scott-Knott com 5% de probabilidade

#### Avaliação da produção de conídios

Todos os tratamentos interferiram na reprodução do fungo, obtendo uma baixa produção de conídios em relação aos tratamentos controle (Tabela 2). Pôde-se observar também que o tratamento à base de água contendo KCl (0,1%)

mais óleo mineral resultou em uma menor produção de conídios em comparação ao controle absoluto, que não foi aplicado a nenhum tratamento.

Tabela 2 Conídios produzidos/cm<sup>2</sup> de folhas de eucalipto, quatorze dias após a última aplicação dos tratamentos

<b>Tratamentos</b>	<b>Conídios produzidos x 10<sup>2</sup> conídios/cm<sup>2</sup> de folha</b>
NEFID	0.42 a
NEFID 25% +75% Fosf. K	0.57 a
NEFID 50% + 50% Fosf. K	0.55 a
NEFID 25% +75% Fosf. Zn	0.56 a
NEFID 50% + 50% Fosf. Zn	0,59 a
NEFID 25% + 75% Fosf. K/Mn	0.52 a
NEFID 50% + 50% Fosf. K/Mn	0.39 a
NEFID 25% + 75% Fosf. Cu	0.34 a
NEFID 50% + 50% Fosf. Cu	0.37 a
Fungicida (piraclostrobina + epoxiconazole)	0.35 a
Controle (Água)	5.60 b
Controle (sem tratamento)	10.58 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott com 5% de probabilidade. Em todos os tratamentos, foram utilizados o óleo mineral Assist (2,5 mL/L) e KCl (0,1%), exceto para a testemunha sem tratamento. A solução estoque dos fosfitos foi preparada na concentração de 4 mL/L e do extrato vegetal NEFID a 10%. A dosagem do fungicida foi de 0,5 mL/L

### **Produção média e porcentagem de enraizamento de miniestacas**

As minicepas de eucalipto que não receberam nenhum tratamento foram as que menos produziram miniestacas por planta (Tabela 3). Em relação às formulações à base de extrato vegetal NEFID com os fosfitos, pôde-se observar que as misturas do extrato com 75% fosfito de Zn, 75% fosfito de K/Mn e com 50% fosfito de K/Mn foram as que obtiveram uma menor produção média de miniestacas/planta. Já as outras formulações não diferiram da testemunha à base de água + KCl + óleo mineral e do fungicida, obtendo maior produção média de miniestacas por planta.

Tabela 3 Produção média de miniestacas/planta e porcentagem de enraizamento de miniestacas, seis dias após a segunda aplicação dos tratamentos e três dias após a última coleta

<b>Tratamentos</b>	<b>Produção média de miniestaca/planta</b>	<b>Porcentagem de enraizamento</b>
NEFID	1,90 a	95,72 a
NEFID 25% +75% Fosf. K	1,48 a	97,08 a
NEFID 50% + 50% Fosf. K	1,54 a	96,36 a
NEFID 25% +75% Fosf. Zn	0,89 b	94,17 a
NEFID 50% + 50% Fosf. Zn	1,51 a	95,94 a
NEFID 25% + 75% Fosf. K/Mn	1,08 b	95,54 a
NEFID 50% + 50% Fosf. K/Mn	1,13 b	97,47 a
NEFID 25% + 75% Fosf. Cu	1,55 a	93,65 a
NEFID 50% + 50% Fosf. Cu	1,54 a	94,79 a
Fungicida	1,78 a	87,15 b
Controle (Água)	1,29 a	97,44 a
Controle (sem tratamento)	0,29 c	90,85 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott com 5% de probabilidade. Em todos os tratamentos, foram utilizados o óleo mineral Assist (2,5 mL/L) e KCl (0,1%), exceto para a testemunha sem tratamento. A solução estoque dos fosfitos foi preparada na concentração de 4 mL/L e do extrato vegetal NEFID a 10%. A dosagem do fungicida foi de 0,5 mL/L

Em relação à porcentagem de enraizamento, observou-se que o fungicida à base de piraclostrobina + epoxiconazole e a testemunha que não foi pulverizada com nenhum dos tratamentos obtiveram a menor porcentagem de enraizamento das miniestacas coletadas (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre as formulações testadas e o tratamento controle à base de água que proporcionaram a maior porcentagem de miniestacas enraizadas.

#### **Ação fungitóxica direta dos tratamentos sobre o oídio do eucalipto**

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram verificados o efeito do extrato vegetal NEFID, dos fosfitos e das combinações desses produtos sobre o oídio do eucalipto. Pôde-se observar que o extrato vegetal NEFID foi o tratamento que obteve maior alteração na morfologia das

hifas, conidióforos e conídios do oídio em relação aos fosfitos (Figura 3). Os fosfitos de Cu, Zn e K/Mn também apresentaram modificações na morfologia do fungo, mas com menor intensidade em relação ao extrato vegetal NEFID. O fosfito de K e o tratamento controle à base de água + KCL + óleo mineral apresentaram uma pequena alteração nos conídios e hifas, mas essa alteração foi muito baixa em relação aos outros tratamentos.

As formulações do extrato vegetal NEFID com os fosfitos também apresentaram grandes modificações na estrutura morfológica do oídio, tais como lise da parede das hifas, conidióforo e murchamento dos conídios do fungo quando visualizado por MEV (Figura 4). Pôde-se observar que os danos causados pelas formulações foram mais intensos do os causados quando tratados com o fungicida à base de piraclostrobina + epoxiconazole.

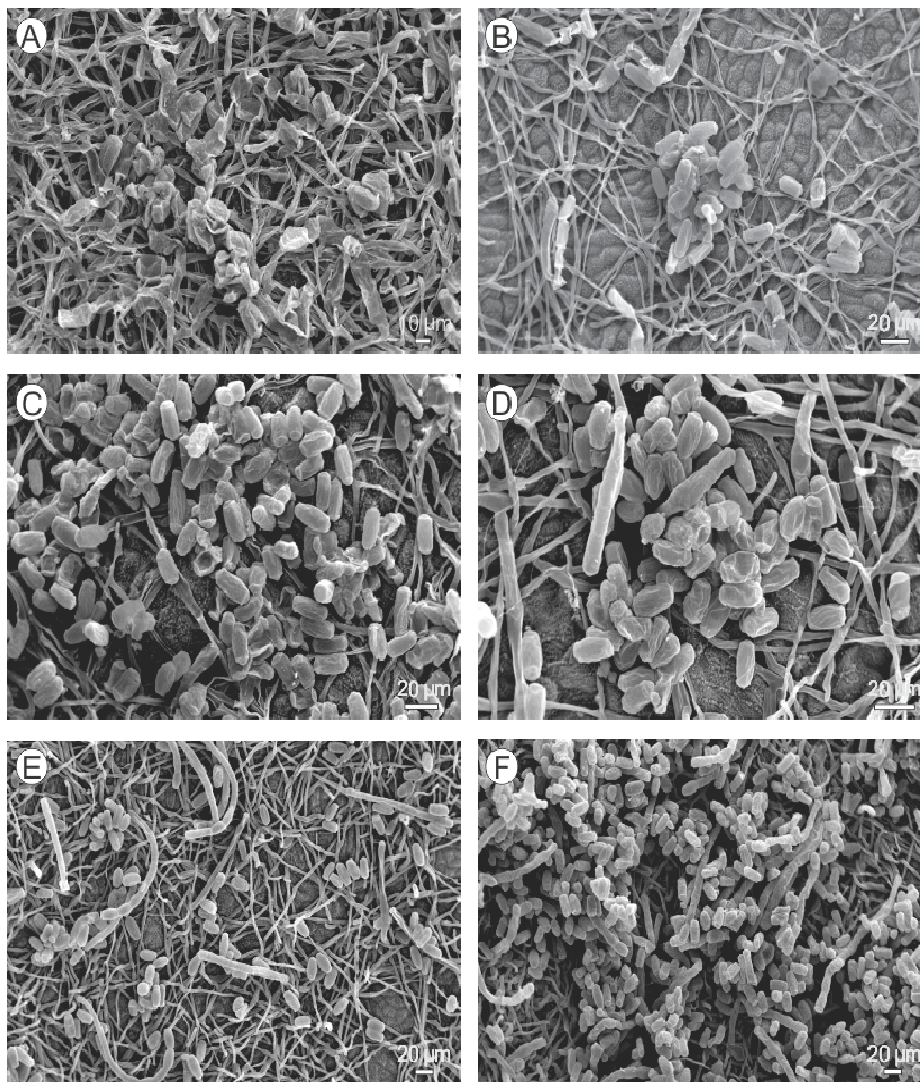


Figura 3 Imagens de microscópio eletrônico de varredura de folhas de eucalipto infectadas com oídio e tratadas com extrato de folha de cafeeiro NEFID (A), fosfito de Zn (B), fosfito de K/Mn (C), fosfito de Cu (D), fosfito de K (E) e tratamento à base de água + KCl a 1% + óleo mineral (F). Observam-se alterações na morfologia dos conídios, murchamento e lise da parede das hifas e conidióforos, principalmente com o uso do extrato Nefid. O fosfito de K e o tratamento controle à base de água + KCL + óleo mineral apresentaram uma pequena alteração na morfologia do oídio

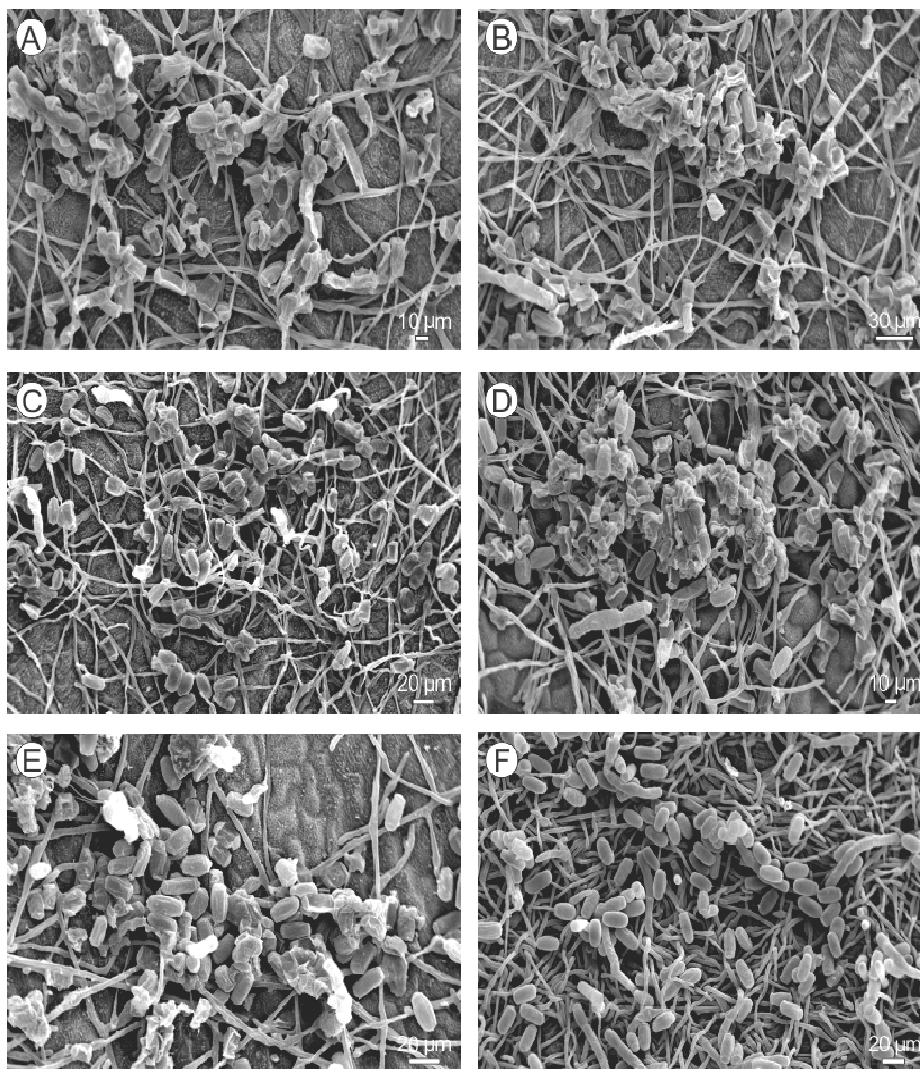


Figura 4 Imagens de microscópio eletrônico de varredura da estrutura do oídio em folhas de eucalipto tratadas com 50% NEFID + 50% fosfito de Zn (A), 50% NEFID + 50% fosfito de Cu (B), 50% NEFID + 50% fosfito de K (C), 50% NEFID + 50% fosfito de K/Mn (D), fungicida à base de piraclostrobina + epoxiconazole (E) e tratamento controle sem pulverização (F). As imagens aqui apresentadas são apenas as de alguns tratamentos, pois todos apresentaram ação fungitóxica

## DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a capacidade do extrato vegetal NEFID e diferentes formulações de fosfito no controle do oídio do eucalipto, pôde-se observar que o extrato vegetal proporcionou um controle mais eficiente do oídio do que os fosfitos e o fungicida piraclostrobina + epoxiconazole. Alguns trabalhos iniciais já têm demonstrando a eficiência do extrato NEFID no controle de fitopatógenos, induzindo os mecanismos de resistência no hospedeiro (BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; SANTOS et al., 2007).

Os fosfitos à base de Cu, Zn e de K/Mn também foram mais eficientes que o fungicida no controle do oídio em mudas de eucalipto. Já o fosfito de potássio não foi eficiente. Alguns trabalhos demonstram a ineficácia do fosfito de potássio no controle de fitopatógenos, tais como *Colletotrichum gloeosporioides* na macieira (ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010), *Verticillium dahliae* em cacauzeiro (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2006) e até mesmo em oomicetos, como *Phytophthora erythroseptica* na batata (AL-MUGHRABI et al., 2007) e *P. infestans* em tomateiro (NASCIMENTO et al., 2008). Bizi et al. (2008) observaram que o fosfito de potássio a 0,6 mL/L e o fosfito de cobre a 0,2 mL/L não controlaram o oídio do eucalipto. No presente trabalho, observou-se que, mesmo na dosagem de 3 mL/L, o fosfito de potássio não foi eficiente no controle desse mesmo patógeno. Em relação fato de o fosfito de cobre não ter controlado o oídio, provavelmente isso tenha ocorrido em função de uma dosagem muito baixa, pois, na dosagem de 3 mL/L, obteve um bom controle da doença. O fato de os fosfitos de Cu, Zn e K/Mn controlar o oídio, diferentemente do fosfito de K, deve-se, provavelmente, à presença do cobre, do zinco e do manganês que têm ação fungitóxica e são importantes cofatores na indução de resistência.

Os fosfitos têm a particularidade de serem os únicos fungicidas sistêmicos que se movem na planta via floema e xilema (GUEST; GRANT, 1991; SAINDRENTANT et al., 1988) sem serem metabolizados por elas (MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001), acumulando-se nas regiões de crescimento rápido, como as raízes e brotos (WHILEY et al., 1995) e lá podendo permanecer por meses ou anos (GUEST; GRANT, 1991; MALUSA; TOSI, 2005). Isso é importante no caso dos oídios que infectam principalmente brotos e folhas novas, os quais, durante o processo de infecção, podem ser diretamente expostos aos fosfitos acumulados.

Outro objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência da mistura do extrato NEFID com os fosfitos no controle do oídio. Foi observada uma potencialização da mistura de 50% do extrato vegetal NEFID e de 50% de fosfito de Cu ou de fosfito de K/Mn, pois essa mistura foi mais eficiente que o próprio extrato. O desempenho de uma substância indutora de resistência, como o NEFID, provavelmente pode ser melhorado, quando esta é associada a outros indutores, como é o caso dos fosfitos, ou mesmo a micronutrientes que atuam como cofatores de enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos (SILVA et al., 2008).

Além de apresentar capacidade de controlar o oídio, a mistura entre o extrato NEFID com os fosfitos interferiu na reprodução do fungo, reduzindo a produção de conídios em minicepas de eucalipto tratadas. Segundo Tzortzakis e Economakis (2007), a inibição da esporulação pode ser devida à interferência dos tratamentos sobre o crescimento micelial e/ou na percepção/transdução de sinais envolvidos na mudança do desenvolvimento vegetativo do fungo para a fase reprodutiva. Alguns trabalhos já verificaram que os fosfitos interferem na produção de esporângios e na liberação de zoósporos (GREENHALGH et al., 1994; GUEST; GRANT, 1991; PANICKER; GANGADHARAN, 1999; WILKINSON et al., 2001). Esse resultado é de grande importância do ponto de



vista epidemiológico, pois a inibição da reprodução do fungo leva à redução do potencial de inóculo do patógeno.

Através da microscopia eletrônica de varredura, pôde-se verificar a ação fungitóxica direta dos tratamentos através das alterações morfológicas no oídio. Os fosfitos causaram modificações na morfologia do fungo, sendo menos intensas quando tratadas com fosfito de potássio. Os fosfitos podem agir diretamente sobre o patógeno formando poros na membrana, levando ao efluxo de conteúdo celular e alterações no potencial de membrana (FERREIRA et al., 2007). Podem agir também nas mudanças transcricionais de vários genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese dos componentes da parede celular, síntese de aminoácidos, metabolismo de proteínas, metabolismo energético, desintoxicação e estresse oxidativo, como verificado em *P. cinnamomi* (KING et al., 2010). O extrato NEFID e a mistura com os fosfitos causaram grandes alterações na estrutura morfológica do oídio. Essas alterações e rompimento das estruturas dos fungos podem resultar na liberação de moléculas eliciadoras, levando a uma indução de mecanismos de defesa das plantas (KING et al., 2010; PEREZ et al., 1995).

A probabilidade de altos níveis de resistência dos patógenos aos fosfitos é reduzida por eles agirem em vários sítios de ação nos patógenos (DOBROWOLSKI et al., 2008; GUEST; GRANT, 1991). Embora alguns relatos de resistência de isolados já ocorram, como em *Bremia lactucae* na alface (BROWN et al., 2004) e *P. cinnamomi* em abacate (DUVENHAGE, 1994). Os extratos vegetais possuem vários constituintes presentes na sua composição (GODARD et al., 2009) que podem apresentar diferentes modos de ação sobre o patógeno. A combinação dos fosfitos com o extrato NEFID poderia evitar a seleção de patógenos resistentes por apresentar uma mistura de constituintes com diferentes mecanismos de ação. Futuros trabalhos são necessários para analisar os constituintes presentes nesse extrato e nas misturas com os fosfitos.

A mistura de NEFID e fosfito também apresentou um efeito positivo na indução de brotação e de enraizamento em relação à testemunha absoluta. Alguns autores afirmam que os fosfitos em si não têm qualquer efeito estimulante no crescimento de plantas saudáveis (MOOR et al., 2009; THAO; YAMAKAWA, 2009). O fato de as misturas terem aumentado a produção de brotos e o enraizamento deveu-se, provavelmente, ao controle do oídio. As misturas de 50% de fosfito de zinco e 50 e 75% de fosfito de K/Mn no extrato vegetal foram as que menos produziram miniestacas em relação às outras misturas e em relação ao tratamento à base de água +KCl + óleo mineral. Uma explicação para isso pode estar no fato de que as altas concentrações de zinco e de manganês nas misturas interferiram negativamente na produção das miniestacas. Diferentes espécies e cultivares de plantas podem apresentar tolerâncias distintas a altas concentrações de metais (YRUELA, 2005).

No teste de enraizamento, somente o fungicida não diferiu do tratamento controle sem aplicação, obtendo-se uma menor porcentagem de miniestacas enraizadas. Ferreira et al. (2008) observaram que o número médio de miniestacas diminuiu apenas em um dos três clones testados após a aplicação do fungicida epoxiconazole + piraclostrobina. O que não foi observado neste trabalho em relação ao híbrido “urocam” VM1. Os autores verificaram também que esse fungicida diminuiu o enraizamento de miniestacas e a produção de biomassa de raiz de um dos clones de eucalipto testados. É de interesse obter produtos que sejam eficientes no controle de patógeno em minicepas de eucalipto, mas que não interfiram negativamente na produção e no enraizamento de miniestacas.

O tratamento à base de água contendo óleo mineral mais KCl a 0,1% foi mais eficiente no controle do oídio e na produção de brotos e no enraizamento do que o tratamento em que não se fez nenhuma aplicação. Nesse caso, a mistura pode ter apresentado efeito tóxico ou simplesmente a água livre na superfície da

folha pode ter prejudicado o desenvolvimento do oídio. Em MEV, foi observada pequena alteração na morfologia do oídio, quando água contendo óleo mineral mais KCl a 0,1% foi aplicada.

No Brasil, não existe atualmente fungicida registrado para o controle do oídio em eucalipto. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar os pesquisadores e silvicultores a integrar o extrato NEFID e os fosfitos em programas de controle do oídio a fim de reduzir a quantidade de produtos químicos aplicados em viveiros e em minijardins clonais. O extrato NEFID encontra-se em processo de desenvolvimento para ser comercializado como uma alternativa eficiente e menos tóxica para o controle do oídio em eucalipto.

Com os resultados apresentados neste trabalho, pôde-se concluir que a mistura de 50% do extrato vegetal NEFID com 50% de fosfito de cobre é o tratamento mais eficaz no controle do oídio em eucalipto por apresentar alta eficiência curativa, por ser antiesporulante e por não interferir negativamente na produção de brotos e no enraizamento das miniestacas de eucalipto. O extrato NEFID também apresentou características desejáveis para ser usado no controle do oídio. Os fosfitos de Cu, Zn e K/Mn podem desempenhar um papel útil como uma alternativa e/ou método complementar no controle do oídio, mas o fosfito de zinco e de potássio/manganês não devem ser aplicados semanalmente, mas preferencialmente de forma alternada com outros produtos para não interferir na produção de brotos de eucalipto.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo, à FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro e ao laboratório de microscopia eletrônica da Universidade Federal de Lavras/MG.

## REFERÊNCIAS

- AL-MUGHRABI, K. I. et al. In furrow (in sulco) applications of metalaxyl and phosphite for control of Pink rot (*Phytophthora erythroseptica*) of potato in New Brunswick, Canadá. **Plant Disease**, Chicago, v. 91, n. 10, p. 1305-1309, Oct. 2007.
- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de Glomerella em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 54-59, Jan. 2010.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.
- BETTIOL, W.; STADNIK, M. J. Controle alternativo de oídios. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Ed.). **Oídios**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 145-164.
- BIZI, R. M. et al. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 2, p. 144-148, 2008.
- BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P. J. et al. (Ed.). **Diseases and pathogens of eucalypts**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 119-151.
- BROWN, S. et al. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. **Plant Disease**, Chicago, v. 88, n. 3, p. 502-508, Mar. 2004.
- COOLS, H. J.; FRAAIJE, B. A. Are azole fungicides losing ground against Septoria wheat disease?: resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 4, p. 681-684, 2008.
- DOBROWOLSKI, M. P. et al. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 5, p. 928-936, Sept. 2008.

DUVENHAGE, J. A. Monitoring the resistance of *Phytophthora cinnamomi* to fosetyl-AI and H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>. **Yearbook - South African Avocado Growers' Association**, Pretoria, v. 17, n. 1, p. 35-37, 1994.

FERREIRA, E. M. et al. Effectiveness of systemic fungicides in the control of *Quambalaria eucalypti* and their effects on production of eucalypt mini-cuttings for rooting. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 1, p. 161-170, Feb. 2008.

FERREIRA, R. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, Honolulu, v. 8, n. 3, p. 677-700, June 2007.

GODARD, S. et al. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 4, p. 827-837, Aug. 2009.

GREENHALGH, F. C. et al. Control of *Phytophthora* root rot of irrigated subterranean clover with potassium phosphonate in Victoria. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 43, n. 5, p. 1009-1019, Nov. 1994.

GUEST, D. I.; GRANT, B. R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 159-187, Apr. 1991.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 49, n. 1, p. 147-154, 2000.

KING, M. et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 2, p. 425-435, Feb. 2010.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 319-332.

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

MALUSA, E.; TOSI, L. Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: results of field trials. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 3, p. 541-548, June 2005.

MAVROEIDI, V. I.; SHAW, M. W. Effects of fungicide dose and mixtures on selection for triazole resistance in *Mycosphaerella graminicola* under field conditions. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 55, n. 4, p. 715-725, Aug. 2006.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 24, n. 7, p. 1505-1519, Sept. 2001.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, 2009.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MOOR, U. et al. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 264-269, 2009.

NASCIMENTO, A. R. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar-s-metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 53-59, 2008.

PANICKER, S.; GANGADHARAN, K. Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 115-118, 1999.

LIMA, M. L. P.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Estabilidade da resistência de *Capsicum* spp. ao oídio em telado e casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 519-525, set./out. 2004.

PEREZ, V. et al. Enhanced secretion of elicitors by *Phytophthora* fungi exposed to phosphonate. **Cryptogamie Mycologia**, Netherlands, v. 16, n. 2, p. 191-194, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Software.

REBOLLAR-ALVITER, A.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. Pre- and Post-infection activity of azoxystrobin, pyraclostrobin, mefenoxam and phosphite against leather rot of strawberry, caused by *Phytophthora cactorum*. **Plant Disease**, Chicago, v. 91, n. 3, p. 559-564, Mar. 2007.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. Fosfíto de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, jul./ago. 2006.

RIZZO, D. M.; GARBELOTTO, M.; HANSEN, E. A. *Phytophthora ramorum*: integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forests. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 309-335, Sept. 2005.

SAINDRENANT, P. et al. Effect of phosphiti on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, n. 3, p. 425-435, June 1988.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, I. L. S. S. et al. Efeito de nutrientes combinados com indutores de resistência na proteção contra a vassoura de bruxa no cacaueteiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 61-67, jan./fev. 2008.

SILVA, O. C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 6, p. 598-604, June 2011.

SPEISER, B. et al. Control of downy mildew of grapevine with potassium phosphonate: effectivity and phosphonate residues in wine. **Biological Agriculture and Horticulture**, Oxon, v. 17, n. 4, p. 305-312, 1999.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? **Soil Science & Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 228-234, Apr. 2009.

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

WHILEY, A. W. et al. Changing sink strengths influence translocation of phosphonate in avocado (*Persea americana* Mill.) trees. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 46, n. 5, p. 1079-1090, 1995.

WILKINSON, C. J. et al. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 5, p. 587-593, Sept. 2001.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 145-156, 2005.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As medidas normalmente utilizadas pelos produtores de soja e de eucalipto para o controle de doenças, entre elas a ferrugem da soja e o oídio do eucalipto, incluem o uso de produtos químicos. Na maioria das vezes, esses produtos têm alto custo econômico e necessitam de várias aplicações, onerando os custos de produção e causando problemas ambientais e de saúde humana. O fungicida sistêmico piraclostrobina + epoxiconazole está entre os principais produtos utilizados para o controle dessas duas doenças. O uso contínuo de fungicidas com o mesmo princípio ativo pode resultar na resistência do patógeno a esses produtos. No caso dos oídios e da ferrugem asiática, isolados resistentes aos fungicidas químicos sistêmicos são facilmente encontrados.

A identificação de novos compostos químicos possibilita a obtenção de alternativas para um manejo sustentável desses dois patossistemas. Os óleos essenciais das plantas medicinais de *Cordia verbenacea*, *Hyptis marruboides* e *Aloysia gratissima* mostraram ser uma alternativa eficiente no controle curativo da ferrugem da soja. Os óleos e decoctos dessas três espécies de plantas medicinais demonstraram ser mais eficientes que o fungicida no controle do oídio do eucalipto. Além de controlar diretamente o patógeno, esses produtos mostraram capacidade de induzir a resistência sistêmica em mudas de eucalipto.

Outros produtos como os fosfitos de zinco, cobre e potássio/manganês e o extrato vegetal NEFID também foram mais eficientes do que o fungicida utilizado pelos viveiristas no controle do oídio do eucalipto. Também se observou, uma potencialização da mistura entre o extrato NEFID com os fosfitos, com destaque para a mistura contendo 50% de extrato com 50% de fosfito de cobre.

Esses trabalhos apresentaram novas alternativas que podem ser usadas no controle do oídio e da ferrugem asiática e que causam menores problemas ambientais e à saúde humana, caso sejam usadas de forma adequada.

Novos testes usando esses produtos devem ser feitos em novos patossistemas, principalmente no controle do oídio em outras culturas. Também se deve testar as capacidades desses produtos em controlar outros patógenos da cultura da soja e do eucalipto, verificando sua capacidade de tornar essas culturas inunes contra vários patógenos importantes da cultura. Poderia também explorar os princípios ativos desses óleos e extratos, criando formulações eficazes no controle das doenças em plantas.