



FABIANO JOSÉ PERINA

**CONTROLE DE *Erysiphe diffusa* COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E LEITE: ESTUDOS
ULTRAESTRUTURAL E DO MODO DE AÇÃO**

LAVRAS - MG

2011

FABIANO JOSÉ PERINA

**CONTROLE DE *Erysiphe diffusa* COM ÓLEOS ESSENCIAIS E LEITE:
ESTUDOS ULTRAESTRUTURAL E DO MODO DE AÇÃO**

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

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

Dr. Hilário Antonio de Castro

LAVRAS- MG

2011

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

Perina, Fabiano José.

Controle de *Erysiphe diffusa* com óleos essenciais e leite :
estudos ultraestrutural e do modo de ação / Fabiano José Perina. –
Lavras : UFLA, 2011.

100 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Oídio. 2. Indução de resistência. 3. Microscopia eletrônica. 4.
Doenças fúngicas. 5. Controle alternativo. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

FABIANO JOSÉ PERINA

**CONTROLE DE *Erysiphe diffusa* COM ÓLEOS ESSENCIAIS E LEITE:
ESTUDOS ULTRAESTRUTURAL E DO MODO DE AÇÃO**

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

APROVADA em 17 de fevereiro de 2011

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza UFLA

Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes UFLA

Dr. Eduardo Alves

Orientador

Dr. Hilário Antonio de Castro

Coorientador

LAVRAS - MG

2011

“Dedico este manuscrito aos meus pais e a minha amada, pelo apoio cúmplice e incondicional nesta e em outras ocasiões importantes da minha vida; e a Deus, por me fornecer saúde e força de vontade”.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pela orientação, ímpar compartilhamento de conhecimentos atenção, dedicação, paciência e amizade. Sua competência e confiança foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig, pelo apoio financeiro na manutenção de equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA.

Ao mestrando Douglas Carvalho Amaral, pela atenção, dedicação e auxílio na condução dos experimentos, os quais foram essenciais para a concretização do trabalho.

Aos amigos Glauco, Eloísa Lopes, Cláudia Labory e Rafael Fernandes, por toda amizade, incentivo na realização dos trabalhos, paciência na realização de amostragens, auxílio durante toda a aprendizagem e período de trabalho juntos, pela alegria e bom humor no dia a dia.

A minha noiva, Letícia Makiyama, pela dedicação, atenção, compreensão, carinho, paciência e todo o conjunto de atributos que contribuíram de maneira ímpar para toda a minha dedicação e entusiasmo na realização do trabalho em todas as etapas de minha vida, o que a torna a pessoa especial que é na minha vida.

Aos meus pais, por todo o auxílio pessoal, por se preocuparem com minha saúde e bem-estar e pela compreensão, dedicação, incentivo e convicção em meus objetivos.

Ao professor Dr. Paulo Estevão e à Dra. Sara M. Chaulfoun, pela gentileza em aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

RESUMO

Dentre as doenças de importância econômica da cultura da soja, o oídio tornou-se uma ameaça constante após o surto na safra de 1996/97. Óleos essenciais (OE) e leite de vaca *in natura* (LE) consistem em produtos promissores para o controle da doença no sistema de cultivo orgânico. Desse modo, o presente trabalho foi conduzido em duas etapas: na etapa inicial teve como objetivo selecionar e avaliar o potencial de óleos essenciais e leite de vaca *in natura* no controle do oídio da soja, selecionando os produtos promissores e, na etapa posterior, objetivou-se avaliar esses produtos promissores em combinação, a fim de explorar possíveis efeitos aditivos e elucidar o modo de ação. Para tanto, foram realizados três experimentos, visando avaliar e selecionar produtos alternativos promissores compostos por óleos essenciais (OE) e leite *in natura* (LE) e quatro experimentos para a determinação da efetividade e elucidação do modo de ação da combinação entre produtos efetivos selecionados na primeira etapa. Foram selecionados produtos compostos por OE de capim-limão (CL) e citronela (Ci) e pelo leite *in natura* (LE) na primeira etapa. Já na etapa seguinte, destacou-se o produto da combinação entre OE de CL e o LE que, mesmo com 50% de redução na concentração dos ingredientes ativos (CL e LE)/2, mostrou efetividade contra o oídio da soja. Esse produto da combinação de ingredientes ativos apresentou um efeito aditivo no controle da severidade da doença e apresentou modo de ação tanto curativo, demonstrando efeito direto sobre o patógeno, quanto preventivo, como indutor de resistência das plantas. Ambos culminaram na redução da severidade da doença.

Palavras-chave: Controle alternativo. Microscopia eletrônica. Indução de resistência. Oídio.

ABSTRACT

Among the economically important diseases of soybean, powdery mildew, has become a constant threat since the outbreak in 1996/97. Essential oils (OEs) and cow whole milk (LE) consist of alternative products for disease control in organic farming. Thus, the present study was conducted in two stages: In the initial stage was aimed at selecting and evaluating the potential of essential oils and whole cow milk to control powdery mildew of soybean products by selecting promising and, in the next stage, aimed at evaluating and elucidate the mode of action of these promising products in combination in order to explore possible additive effects. For this were carried three experiments for the initial selection of alternative products promising compounds for essential oils (OEs) and whole milk (LE) and four experiments to determine the effectiveness and elucidate the mode of action of the combination of effective products selected in the first stage. Were selected products composed of OEs of lemon grass (CL) and citronella (Ci) and whole milk (LE) in the first stage, already highlighted in the next step is the product of the combination of OE CL and LE that even with 50% reduction in the concentration of active ingredients (CL LE) / 2 has shown effectiveness against powdery mildew in soybeans. This product of the combination of active ingredients showed an additive effect in controlling disease severity and has both curative action mode featuring direct effect on the pathogen such as preventative as inducer of resistance of plants, both led a reducing the severity of the disease.

Keywords: Alternative control. Electron microscopy. Induction of resistance. Powdery mildew

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	Introdução Geral	13
1	INTRODUÇÃO		13
2	REFERENCIAL TEÓRICO		16
2.1	Sintomatologia		17
2.2	Sobrevivência e disseminação		17
2.3	Manejo da doença		18
2.4	Uso de produtos naturais como fonte de substâncias ativas no controle de doenças de plantas		19
2.5	Efeitos biológicos de óleos essenciais e leite sobre fitopatógenos		20
2.6	Uso da microscopia eletrônica no estudo da interação planta-patógeno		22
2.7	Indução de resistência		24
	REFERÊNCIAS		27
	CAPÍTULO 2	Óleos essenciais e leite no controle do oídio da soja	34
1	INTRODUÇÃO		36
2	MATERIAL E MÉTODOS		39
2.1	Plantio e condução das plantas		39
2.2	Obtenção do inóculo e inoculação de <i>Erysiphe diffusa</i>		39
2.2.1	Inoculação das plantas por <i>E. diffusa</i>		40
2.3	Obtenção e preparo dos óleos essenciais, leite e demais padrões utilizados		41
2.4	Avaliação do efeito de OE e do LE, na germinação de conídios de <i>E. diffusa</i> em folíolos previamente tratados		41

2.5	Avaliação e seleção de produtos compostos por OE e LE por meio de experimento em casa de vegetação utilizando plantas de soja infectadas por <i>E. diffusa</i>	43
2.6	Estudo da efetividade de produtos alternativos contra <i>E. diffusa</i> , por meio da microscopia eletrônica de varredura em folíolos submetidos ao tratamento curativo.....	44
2.7	Análise estatística.....	45
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1	Avaliação e seleção de produtos compostos por OE e LE por meio de experimento em casa de vegetação usando plantas de soja infectadas por <i>E. diffusa</i>	48
3.2	Estudo da efetividade de produtos alternativos contra <i>E. diffusa</i> , por meio da microscopia eletrônica de varredura, em folíolos submetidos ao tratamento curativo.....	52
4	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	CAPÍTULO 3 Óleos essenciais e leite no controle do oídio da soja: modo de ação	60
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Plantio e condução das plantas	64
2.2	Obtenção do inóculo e inoculação das plantas por <i>Erysiphe diffusa</i>	64
2.2.1	Inoculação das plantas para o experimento de avaliação do efeito curativo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja	65
2.2.2	Inoculação das plantas para o estudo do efeito na severidade do oídio da soja em plantas submetidas ao	

	tratamento preventivo e estudo bioquímico de plantas tratadas previamente.....	65
2.3	Obtenção e preparo dos óleos essenciais, leite e demais produtos utilizados.....	66
2.4	Efeito curativo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja	67
2.5	Efeito preventivo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja	68
2.6	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folíolos de soja submetidos ao tratamento curativo e preventivo pela combinação de OE de CL e LE.....	69
2.7	Caracterização dos mecanismos bioquímicos (peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase) envolvidos na resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não com os produtos alternativos efetivos contra <i>E. diffusa</i>	70
2.7.1	Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase	71
2.7.2	Proteínas totais.....	71
2.7.3	Peroxidase de guaiacol.....	71
2.7.4	Polifenoloxidase.....	72
2.7.5	Quitinase.....	72
2.7.6	β -1,3-glucanase	73
2.8	Análises estatísticas.....	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1	Efeito preventivo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja	79

3.2	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folíolos de soja submetidos ao tratamento curativo e preventivo pela combinação de OE de CL e LE.....	82
3.3	Caracterização dos mecanismos bioquímicos (peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase) envolvidos na resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não com os produtos alternativos efetivos contra <i>E. diffusa</i>	85
4	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, sendo cultivada em várias partes do mundo. Tem grande importância na dieta alimentar humana e animal, sendo considerada a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal.

A produção nacional de soja nos últimos três anos apresentou baixa oscilação, onde na safra de 2008/09 foi de 57,1 milhões de toneladas, produção 4,8% inferior à obtida na safra anterior (2007/08) momento em que o Brasil produziu 60 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009), já na safra de 2009/10, atingiu um novo recorde de produção de 68,71 milhões de toneladas, conforme o último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento. O recorde também foi alcançado em termos de produtividade média, com 2.941 kg.ha⁻¹.

Apesar da grande capacidade de adaptação, a soja é infectada por grande número de agentes patogênicos, que limitam o rendimento da cultura, sendo já registradas mais de 100 doenças em todo o mundo (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999). No Brasil, 35 dessas doenças são consideradas de importância econômica (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Dentre essas doenças de importância econômica da cultura, tem-se o oídio da soja, que foi observado pela primeira vez na Alemanha em 1921 e atualmente é distribuído a nível mundial (GRAU, 1984; WAHL, 1921 citado por ALMEIDA et al., 2008). O oídio da soja se tornou uma doença preocupante após o surto na safra de 1996/1997, em todas as áreas cultivadas da região dos

Cerrados do Brasil central ao Rio Grande do Sul. Desde então, a doença passou a ser uma ameaça constante aos agricultores, com perdas relatadas de até 25% (ALMEIDA et al., 2008). O oídio da soja é favorecido por condições de estiagem, cada vez mais constantes durante o ciclo da cultura, afetando principalmente cultivares tardias.

O uso de cultivares resistentes consiste no método de controle de doenças em plantas mais eficiente, porém, devido à grande variabilidade patogênica de *E. diffusa*, algumas cultivares podem ter a resistência “quebrada” pelo patógeno. Assim, conforme ressaltam Yorinori et al. (1993), cabe aos produtores a adoção de práticas que reduzam o inóculo inicial desse patógeno na lavoura.

Historicamente observa-se que, em todo o mundo onde se pratica uma agricultura econômica, são utilizados produtos químicos para o controle de doenças de plantas (KIMATI et al., 1997). O uso racional desses produtos tem efeito benéfico para os produtores em curto prazo, entretanto, em longo prazo, pode ocorrer a seleção de novas raças resistentes dos patógenos, além da contaminação do ambiente e à saúde humana. Desse modo, a agricultura alternativa aos produtos nocivos baseia-se na busca de medidas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (ZADOKS, 1992).

Os óleos essenciais têm sido largamente estudados no manejo alternativo de doenças de plantas, consistindo em boa alternativa aos produtores de alimentos orgânicos. Possuem a característica de apresentar menor agressividade ao meio ambiente e ao homem, além de mostrar resultados promissores em pesquisas atuais. Plantas superiores, muitas vezes, são vistas como fontes úteis de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas aos fungicidas sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o ambiente, podendo até superá-los em sua ação fungitóxica (FAWCETT; SPENCER,

1970), além de poder induzir resistência às doenças nas plantas (SCHWAN-
ESTRADA, 2003).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O oídio da soja, que tem como etiologia o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* (BRAUN; TAKAMATSU, 2000), é de uma das doenças mais antigas dessa leguminosa. Inicialmente, o oídio da soja foi atribuído ao fungo *Erysiphe polygoni* Dc. ex. Merat, a *Microsphaera diffusa* Cook e Peck, porém, atualmente *Erysiphe diffusa* é considerado como principal causador do oídio nesta cultura (TAKAMATSU et al., 2002).

Conforme Braun e Takamatsu (2000), *Microsphaera* e *Erysiphe* são agrupados em um clado e não podem ser separados um do outro em filogenia. Eles propuseram combinar os gêneros *Erysiphe*, *Microsphaera* e *Uncinula* em um único gênero, com base em estudos em filogenia molecular e microscopia eletrônica de varredura de conídios (ALMEIDA et al., 2008).

O fungo se desenvolve em toda a parte aérea da soja, incluindo folhas, hastes, pecíolos e vagens, produzindo micélio na superfície da planta, garantindo sua nutrição por meio da emissão de haustórios intracelulares. A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais visível por ocasião do início da floração, causando perdas substanciais (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006).

No Brasil, até a safra de 1995/1996, o oídio era considerado uma doença sem grande importância econômica na cultura soja e, que devido às suas características peculiares, encontrava-se associado às plantas principalmente em condições de casa de vegetação. Já a campo era encontrado incidindo sobre cultivares tardias, principalmente no na região sul do Brasil e nas regiões altas do Cerrado, em altitudes acima de 800 m (SARTORATO; YORINORI, 2001). A partir da safra 1996/1997, perdas significativas foram observadas, sendo sua incidência variável em função da região e das condições climáticas vigentes (KIMATI et al., 2005).

2.1 Sintomatologia

Os sintomas apresentados pelo oídio podem variar de clorose, ilhas verdes, manchas ferruginosas, desfolha acentuada ou combinações desses sintomas, dependendo da reação das cultivares. Os sinais do patógeno são caracterizados por estruturas brancas, constituídas por uma fina camada de micélio e conídios pulverulentos, nas partes atacadas, formando-se uma cobertura de pequenos pontos brancos, que evoluem cobrindo toda superfície da folha, vagens e das hastes em infecções mais severas.

Segundo Sinclair (1999 citado por SARTORATO; YORINORI, 2001), o fungo pode se desenvolver abundantemente sobre as partes infectadas, sem apresentar sintomas visíveis. Lavouras afetadas pelo oídio podem ser distinguidas à distância pela coloração prateada da face inferior das folhas quando expostas ao vento. Em condições severas, causa crestamento foliar, podendo ser confundido com sintomas de crestamento foliar de *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*). Nessas condições, a lavoura fica com aparência de soja dessecada por herbicida, mantendo apenas as hastes e as vagens verdes por certo período.

2.2 Sobrevivência e disseminação

O fungo *Erysiphe diffusa* depende da planta viva para sobreviver. Assim, por consistir num parasita biotrófico, não pode sobreviver em restos culturais. Portanto, sua principal forma de sobrevivência consiste nas plantas remanescentes, também chamadas tiguera ou restevas ou, ainda, em hospedeiros alternativos sejam eles plantas daninhas e ou plantas cultivadas. Essas plantas podem manter e aumentar o potencial de inóculo entre as estações de cultivo. Pode, ainda, haver a formação de corpos de frutificação da fase sexuada

(teleomorfo), do tipo chasmotécium (derivado de apotécio), atuando como forma de resistência do patógeno de um cultivo a outro. Porém, até o momento, não foi constatada a presença do teleomorfo em plantas de soja no Brasil.

Os conídios de *E. diffusa* são facilmente disseminados para lavouras tanto próximas como a longas distâncias, pelo vento e insetos vetores. As condições favoráveis à ocorrência da doença são temperaturas amenas, entre 18 e 24°C; já a 30°C observa-se o início da interrupção do crescimento micelial (SARTORATO; YORINORI, 2001).

O processo de pré-infecção, bem como germinação e reprodução de *E. diffusa*, se inicia após três horas da inoculação (MIGNUCCI; CHAMBERLAIN, 1978 citado por SARTORATO; YORINORI, 2001). Com oito horas, o apêndice de infecção é formado, penetrando às células epidérmicas. Desse modo, o fungo penetra na cutícula, formando os haustórios nas células da epiderme, não infectando as células do mesofilo, ocorrendo a formação dos conídios após 144 horas da inoculação.

2.3 Manejo da doença

O manejo das doenças de plantas deve ser empregado no intuito de reduzir os danos provocados para níveis economicamente aceitáveis, sem prejuízos para os agroecossistemas, mantendo seu equilíbrio (ZAMBOLIM; VALE; VENTURA, 1995). Sendo assim, conforme Sartorato e Yorinori (2001), o método mais eficiente e econômico de controle do Oídio é o uso de cultivares resistentes. Porém, cultivares consideradas imunes na safra de 1996/1997 apresentaram suscetibilidade em safras subsequentes, mostrando grande variabilidade patogênica de *E. diffusa*.

Como medidas de controle da doença, algumas práticas culturais podem ser adotadas, bem como o plantio em época menos favorável ao patógeno,

semeadura e densidade de plantio adequado e uma adubação equilibrada. O controle químico pode ser utilizado, até o estágio R6 em cultivares suscetíveis, utilizando-se fungicidas registrados à base de enxofre, ou do grupo dos triazóis e benzimidazóis. Porém, o uso indiscriminado desses produtos possibilita o aparecimento de possíveis problemas, como seleção de raças resistentes dos patógenos a produtos do grupo dos triazóis e benzimidazóis, devido à alta variabilidade de *E. diffusa*, a contaminações ao meio ambiente e à toxidez ao homem (BETTIOL; GHINI; MORANDI, 2005).

2.4 Uso de produtos naturais como fonte de substâncias ativas no controle de doenças de plantas

O melhoramento convencional largamente utilizado ao longo dos anos visava o contínuo aumento de produtividade. Em decorrência disso, as plantas tornaram-se cada vez menos resistentes às pragas e doenças. Problemas antes considerados secundários passaram a ter grande importância devido ao desequilíbrio nutricional e ecológico provocado pelos chamados “defensivos agrícolas” (BETTIOL; GHINI; MORANDI, 2005)

Conforme Bettiol, Ghini e Morandi (2005), o aumento da contaminação do ambiente pelos pesticidas utilizados na agricultura causa problemas como redução da biodiversidade, alterações na ciclagem de matéria orgânica e dos nutrientes, no controle biológico natural de doenças e pragas, nas atividades microbianas do solo, na seleção de organismos resistentes aos pesticidas e nas alterações das populações de organismos do solo e água.

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. (AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF, 2009). A utilização dos defensivos na agricultura, além de oferecer risco de vida ao

aplicador, trouxe como consequência a contaminação de água, dos animais, dos alimentos, dos solos e do próprio homem.

Em decorrência disso, plantas superiores são fontes úteis de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas com fungicidas sintéticos, mostraram-se praticamente inofensivas para o ambiente, podendo até superá-los em sua ação fungitóxica (FAWCETT; SPENCER, 1970). Com isso, considerando que o Brasil é um dos países mais ricos do mundo em espécies vegetais nativas e introduzidas, possibilita-se a oportunidade ímpar de buscar nas reservas naturais substâncias que atuem sobre pragas e doenças da agricultura.

2.5 Efeitos biológicos de óleos essenciais e leite sobre fitopatógenos

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleos essenciais de plantas pode constituir, ao lado da indução de resistência, mais uma forma potencial de controle de doenças em plantas cultivadas. Além disso, os óleos essenciais apresentam ampla distribuição em vegetais superiores.

Nesse contexto, Lemos et al. (1990), avaliando os óleos essenciais de dez plantas brasileiras quanto às suas atividades antimicrobianas, verificaram que o óleo essencial de *Lippia sidoides* exibiu grande atividade contra todos os microrganismos testados, como *Saccharomices cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *Cryptococcus neofarmans*.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto de óleo essencial obtido a partir de plantas medicinais têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com característica de eliciadores (SCHWAN-ESTRADA, 2003).

Em experimentos realizados com plantas medicinais tem sido detectada a presença de compostos fungitóxicos por meio de cromatografia delgada. Stangarlin et al. (1999) verificaram a presença de frações nas quais houve inibição do desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola*. Observaram também a presença de duas frações fungitóxicas bem definidas nos extratos de capim-limão e uma nos de cânfora e alfavaca.

Observadas tais evidências, Rios et al. (2003), ao trabalharem com o extrato de citronela nas concentrações de 5%, 10% e 15%, *in vitro*, observaram redução parcial do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* Simonds, enquanto que na concentração de 20% ocorreu inibição total deste crescimento. Já Medice et al. (2004), estudando o óleo essencial de citronela, verificaram que, *in vitro*, a concentração a 20% do óleo essencial foi suficiente para apresentar uma inibição de 100% na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem da soja, mostrando alta atividade antifúngica do óleo essencial.

O leite de vaca tem sido utilizado como forma alternativa de controle de oídios em diferentes culturas. Nesse contexto, Bizi et al. (2008) observaram uma redução de 36,5% na severidade de oídio (*Oidium* sp.) em mudas de *Eucalyptus benthamii*, utilizando leite de vaca a 20% em água sob forte concentração de fonte de inóculo em casa de vegetação.

Bettioli, Astiarraga e Luiz (1999), ao utilizarem a solução de leite de vaca cru, na concentração de 5% e 10%, observaram grande redução na severidade do oídio em plantas de abobrinha, recomendando seu emprego nas concentrações testadas, para o controle de oídio causado por *Sphaerotheca fuliginea* em cucurbitáceas. Ainda nesse contexto, Zatarim, Cardoso e Furtado (2005) obtiveram bons resultados empregando leite de vaca cru para o controle de oídio causado por *Sphaerotheca fuliginea* em abóbora cultivar Piramoita. Já Santos (2009) obteve controle eficiente do mesmo patógeno em abobrinha cv.

Caserta, ao usar solução de leite a 10% em água, tendo obtido resultados superiores aos de outros produtos biocompatíveis analisados. Porém, o modo de ação desse produto não foi completamente compreendido.

Sobre o modo de ação do leite em oídios de plantas, apesar da ampla utilização citada por Bettiol e Astiarraga (2003) e os avanços sobre os mecanismos de ação, os resultados ainda são inconclusivos. Bettiol, Astiarraga e Luiz (1999) sugerem, como possíveis modos de ação, a atividade germicida direta sobre o patógeno, a indução de resistência do hospedeiro ou o estímulo de antagonistas. Já Crisp et al. (2004) demonstraram o potencial do leite no estímulo da microbiota epifítica e observaram alterações na morfologia de hifas e conídios. Em decorrência, Medeiros (2006), ao estudar o mecanismo de ação e as atividades de frações do leite no controle do oídio da abobrinha, verificou a formação de um filme na superfície de folhas tratadas com leite, inibindo tanto a germinação como a penetração do fungo.

2.6 Uso da microscopia eletrônica no estudo da interação planta-patógeno

A microscopia eletrônica é uma importante ferramenta de estudos ultraestruturais, principalmente para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, eventos de reação da planta, como indução de resistência e, até mesmo, da ação de produtos para o controle de doenças. A maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou a resistência da hospedeira ocorre em nível celular, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos e moleculares, mas sua visualização só é possível através de estudos morfológicos. Assim, Alves, Leite e Kitajima (2008) ressaltam que, para visualizar tais processos de infecção, os microscópios

de luz (ML), o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições.

Nesse contexto, Lichston e Godoy (2006) observaram que a aplicação de fungicida à base de oxiclóreto de cobre diminui o teor e altera a morfologia da cera epicuticular em duas cultivares de café, Obatã e Catuaí Vermelho. Mclean e Byth (1980) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de uredinósporos de *P. pachyrhizi* em cultivares suscetíveis, resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todas as cultivares, não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo; houve diferença na percentagem de uredinósporos germinados, formação de apressório e penetração.

Bonde, Melching e Bromfiel (1976) e Koch, Ebrahin-Nesbat e Hoppe (1983) utilizaram a ML, MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nesta interação. Adendorff e Rijkenberg (2000) aplicaram a MEV no estudo do processo de infecção de outra espécie de *Phakopsora*, *P. apoda*, mostrando que o processo é bem semelhante aos de *P. pachyrhizi*. Vários outros exemplos existem na literatura com a aplicação da microscopia eletrônica no estudo de vários patossistemas.

Em relação ao patossistema soja-*Erysiphe diffusa*, nenhum estudo ultraestrutural foi encontrado. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos estruturais de resistência da soja a este patógeno será de grande importância para a obtenção de um modelo de resistência morfológica ou bioquímica que possa ser aplicado a outras enfermidades que acometem a cultura, assim como fornecer subsídios para os programas de melhoramento que objetivam novas cultivares resistentes, bem como a programas de manejo que visam medidas sustentáveis.

2.7 Indução de resistência

A indução de resistência em plantas pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas ou químicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos representa um importante método alternativo no manejo de doenças, o qual atua ativando os mecanismos de defesa da planta que se encontram na forma latente. O fenômeno da indução de resistência é estudado há décadas, visando encontrar medidas alternativas de controle de doenças em plantas. Beauverie e Ray (1901 citado por KESSMANN et al., 1994), foram os pioneiros nestes estudos, demonstrando que estirpes fracas de *Botrytis cinerea* tornavam plantas de *Begonia* sp. resistentes às estirpes virulentas do fungo.

A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou, mesmo, durar todo o ciclo de vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995), passando assim a funcionar como um mecanismo de defesa constitutivo da planta. Resende et al. (2004) afirmam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos. Esta resistência poderá ocorrer devido a estímulos diferentes da doença. Como exemplo dessa utilização, cita-se o uso de substâncias como ácido salicílico (AS) e o acibenzolar S-metil (ASM) para a ativação da resistência.

A ativação de defesas das plantas a partir da elicitação por compostos bióticos pode ser obtida por extratos de plantas (STANGARLIN et al., 1999), leveduras (STADNIK; BETTIOL, 2000), exopolissacarídeos bacterianos (CASTRO; BACH, 2004), rizobactérias promotoras de crescimento

(VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002), fungos promotores de crescimento (MADI; KATAN, 1998), raças avirulentas do patógeno (MONOT et al., 2002), além do próprio patógeno inativado (BACH et al., 2003) e ataques de insetos, dentre outras pragas. Por outro lado, a resistência induzida pode ser obtida por meio de eliciadores abióticos como AS (CIPOLLINI, 2002), ácido D-L-aminobutírico (BABA) (ZIMMERLI et al., 2000), quitosana (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998), acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (BESSER et al., 2000), ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJa) (HEIJARI et al., 2005), entre outros agentes abióticos e fatores e componentes físicos que acarretam condições adversas às plantas e desencadeiam respostas de defesa nas mesmas. Esses agentes indutores não atuam diretamente sobre o patógeno ou produzem algum composto antimicrobiano, mas sim sensibilizam a planta para disparar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

O ácido salicílico foi o primeiro composto produzido por plantas a ter sua atividade como indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR). Posteriormente, um análogo de AS, ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), foi o primeiro composto sintético a ativar a resistência sistêmica adquirida (SAR). Entretanto, tanto AS como INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, portanto, não têm potencial para serem utilizados comercialmente como protetores de plantas. Outro análogo do AS, o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotioico (BTH), um composto do grupo benzotiadiazole, comportou-se como ativador potente de SAR, possibilitando a proteção em condições de campo, contra um amplo espectro de patógenos em diversos cultivos (GÖRLACH et al., 1996).

Estudos recentes têm focado o modo de ação de produtos sintetizados em laboratório a partir do AS, caracterizados como ativadores de resistência de plantas, principalmente o BTH (MORAES, 1998).

Martins et al. (1998) verificaram ação protetora do ASM em mudas de café. Este foi capaz, em condições controladas, de induzir proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas. Esse efeito indutor do ASM contra ferrugem do cafeeiro foi confirmado por Nojosa et al. (2008), em cujo trabalho o tratamento com ASM proporcionou controle de 56,82% em folhas destacadas e 52% em mudas de café. Nas plantas tratadas com ASM foi possível observar aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, de lignina e na atividade de peroxidases.

Ao reconhecer alguma substância eliciadora do processo de infecção, a planta ativa seu sistema de defesa, que possui diferentes mecanismos de ação, sendo estes bioquímicos como proteínas PR (quitinases, glucanases e peroxidases), fitoalexinas e fenóis, ou estruturais, como lignina, ceras, papilas e etc.

Trabalhos envolvendo a indução de resistência da soja contra *Erysiphe diffusa* não são encontrados na literatura até o momento. Assim, a possível indução de resistência por óleos essenciais em plantas de soja, bem como pela solução de leite e possíveis combinações efetivas, será mais bem compreendida, com a caracterização dos mecanismos bioquímicos e ultraestruturais envolvidos na interação hospedeiro-patógeno-ambiente.

Diante da carência de produtos alternativos aos agrotóxicos com efetividade para o controle de doenças, o presente trabalho foi realizado com o propósito de selecionar produtos alternativos compostos por óleos essenciais (OE) e leite *in natura* (LE), avaliar a efetividade desses por meio de diferentes modos de aplicação e fazer inferências sobre o(s) modo(s) de ação predominante(s) desses produtos.

REFERÊNCIAS

ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Scanning electron microscopy of direct host leaf penetration by urediospore-derived infection structures of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 3, p. 317-324, Mar. 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Brasil supera EUA no consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/informativo/andef.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.

ALMEIDA, A. M. et al. Caracterização de isolados de oídio de soja, feijão, girassol e plantas daninhas no Brasil usando sequências de rDNA-ITS. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 21-26, fev. 2008.

ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, p. 433-466.

BESSER, K. et al. Analysis of gene induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, n. 5, p. 277-286, Sept. 2000.

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. v. 1, p. 191-215.

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D.; LUIZ, A. J. B. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 489-492, Sept. 1999.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Controle alternativo de pragas e doenças. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. p. 163-183.

BIZI, R. M. et al. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 144-148, Jan. 2008.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 290-294, Jan. 1976.

BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. Phylogeny of Erysiphe, Microsphaera, Uncinula (Erysipheae) and Cystotheca, Podosphaera, Sphaerotheca (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, Garten, v. 4. n. 1, p. 1-33, Feb. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos safra 2008/2009: décimo primeiro levantamento**, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 ago.2009.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 2, p. 210-216, May 2002.

CRISP, P. et al. Sustainable control of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ORGANIC WINE GROWING, 1., 2004, Stugart. **Abstract guide...** Stugart: Organic Europe, 2004. p. 47-52.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção região central do Brasil**. Brasília: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 225 p.

FAWCETT, C. H.; SPENCER, D. M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 403- 17, Apr. 1970.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 8, n. 4, p. 629-643, Jan. 1996.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul: APS, 1999. 104 p.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, n. 2, p. 439-459, Sept. 1994.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KIMATI, H. et al. **Guia de fungicidas agrícolas: recomendações por cultura**. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. 225 p. v. 1.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 106, n. 1, p. 302-320, Feb. 1983.

LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phototherapy Research**, Chichester, v. 4, n. 2, p. 82-84, Mar. 1990.

LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 919-926, jun. 2006.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, n. 1, p. 163-175, Feb. 1998.

MARTINS, E. M. et al. Ação protetora do acibenzolar S-metil (Bion[®]) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 1., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: [s.n.] 1998. p. 177-178.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhiziz*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 31, n. 2, p. 951-956, Feb. 1980.

MEDEIROS, F. H. V. **Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha**. 2006. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MEDICE, R. et al. Uso de óleo essencial de Citronela (*Pelargonium graveolens*) no controle da germinação de esporos da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 17., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 37.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, set. 1998.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 60-62, nov. 2008.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 417-454.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Abstract guide...** Helsingor: [s.n.], 2004. p. 79.

RIOS, S. A. et al. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* S. mmonds, agente causal da Flor Preta do Morangueiro (*Fragaria X ananassa* Dulch) com extrato de Citronela (*Cymbopogon* sp). **Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 28, p. 360, ago. 2003.

SANTOS, A. P. **Controle do oídio da abobrinha com antagonistas e produtos biocompatíveis**. 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SARTORATO, A.; YORINORI, J. T. Oídio de leguminosas: feijoeiro e soja. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Org.). **Oídios**. Campinas: Emopi, 2001. v. 1, p. 255-285.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: USP, 2003. p. 147.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 95-116.

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

TAKAMATSU, S. et al. Two Erysiphe species associated with recente outbreak of soybean powdery mildew: results of molecular phylogenetic analysis based on nuclear rDNA sequences. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, n. 4, p. 333- 341, May 2002.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 1-10, Feb. 2002.

YORINORI, J. T. et al. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.; SOUZA, P. I. M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 333-397.

ZADOKS, J. C. The cost of change in plant protection. **Journal of Plant Protection Research**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 2, p. 151-159, Mar. 1992.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; VENTURA, J. A. **Controle integrado de doenças de plantas**. Brasília: ABEAS, 1995. 85 p.

ZATARIM, M.; CARDOSO, A. I. I.; FURTADO, E. L. Efeito de tipos de leite sobre oídio em abóbora plantadas a campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p.198-201, abr./jun. 2005.

ZIMMERLI, L. et al. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, East Lansing, v. 97, n. 7, p. 12912- 12925, Nov. 2000.

CAPÍTULO 2

Óleos essenciais e leite no controle do oídio da soja

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar e selecionar o potencial de óleos essenciais e do leite de vaca no controle do oídio da soja. Foram realizados três experimentos: experimento *in vitro*, para a determinação da capacidade de inibição da germinação de conídios de *Erysiphe diffusa* por óleos essenciais (OE) de citronela, capim-limão, eucalipto globulus, canela e melaleuca e leite (LE), aplicados de modo preventivo; experimento em casa de vegetação para avaliação e seleção de produtos efetivos compostos por OEs e LE, na redução da severidade do oídio da soja; e um experimento para a verificação do efeito de LE e OEs por meio da análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura em folíolos de soja infectados por *Erysiphe diffusa*. Pôde-se observar efeito de inibição na germinação de conídios por parte dos OE e pelo LE, demonstrando ação direta por parte desses produtos. Foi possível selecionar os tratamentos compostos por leite (100 mL L⁻¹) e óleos essenciais de citronela e capim-limão a 1 mL L⁻¹, os quais apresentaram controle de 68,7% a 74,2%. Todos os produtos testados apresentaram efeito direto nas estruturas de *E. diffusa*, revelado por meio da análise de microscopia eletrônica, porém, de menor expressão para os tratamentos compostos por OE de canela e melaleuca.

Palavras-chave: *Erysiphe diffusa*. *Glycine max*. Controle alternativo de doenças de plantas. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate and select the potential of essential oils and whole milk to control of the powdery mildew of the soybean. Three experiments were conducted: *In vitro* experiment to determine the capacity to inhibit of conidial germination of *Erysiphe diffusa* by essential oils (OEs) of citronella, lemon grass, eucalyptus globulus, cinnamon and tea tree, and of the milk (LE), applied on a preventive mode Experiment in the greenhouse for evaluation and selection of effective products consisting of OEs and LE, in reducing the severity of powdery mildew of soybeans, and an experiment to verify the effect of LE and OEs through morphological analysis by scanning electron microscopy in soybean leaflets infected by *Erysiphe diffusa*. It was observed inhibiting effect on germination of conidia by OE and the LE, indicating direct action on the part of those products. It was possible to select treatments consisting of milk (LE) 100 mL L⁻¹ and essential oil of citronella and lemongrass with 1 mL L⁻¹, which showed control 68,7-74,2%. Direct effect was observed in all products tested in the structures of *E. diffusa* through the analysis of electron microscopy, but in lower expression for treatments consisting of OE cinnamon and tea tree.

Keywords: *Erysiphe diffusa*. *Glycine max*. Alternative control of plant disease. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, sendo cultivada em várias partes do mundo. O Brasil é, atualmente, o segundo maior produtor dessa leguminosa, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América. Apesar da grande capacidade de adaptação, a soja é infectada por grande número de agentes patogênicos que limitam o seu rendimento, sendo já registradas mais de 100 doenças, em todo o mundo (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999).

Entre as doenças de importância econômica para o Brasil, destaca-se o oídio da soja, que tem como agente etiológico *Erysiphe diffusa* (BRAUN; TAKAMATSU, 2000). Esse patógeno foi observado pela primeira vez na Alemanha, em 1921 e, atualmente, tem distribuição mundial (ALMEIDA et al., 2008). Esta doença tornou-se preocupante após o surto na safra de 1996/1997, em todas as áreas cultivadas da região dos Cerrados, do Brasil Central ao Rio Grande do Sul. Desde então, passou a ser uma ameaça constante aos agricultores, com perdas relatadas de até 25% (ALMEIDA et al., 2008). No campo, condições como estiagem, presença de hospedeiro alternativo e uso de cultivares tardias, cada vez mais constantes durante o ciclo da cultura, favorecem a perpetuação e o progresso dessa doença.

Conforme Sartorato e Yorinori (2001), o método mais eficiente e econômico de controle do oídio é o uso de cultivares resistentes. No entanto, devido à grande variabilidade patogênica de *E. diffusa*, algumas cultivares podem ter a resistência superada pelo patógeno e, desse modo, o controle químico é o método largamente utilizado, com o emprego de fungicidas registrados, do grupo dos triazóis e benzimidazóis. Todavia, o uso indiscriminado desses produtos possibilita o aparecimento de problemas como

seleção de raças resistentes dos patógenos a fungicidas, devido à alta variabilidade de *E. diffusa*, além de “contaminações ao meio ambiente e toxidez ao homem” (BETTIOL; GHINI; MORANDI, 2005).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF, 2009), assim, com a crescente exigência por produtos vegetais de qualidade, livres de contaminação por microrganismos e resíduos químicos, torna-se necessária a intensificação de pesquisas visando à exploração de produtos que possuam frações ativas sobre fitopatógenos e menos agressivas ao meio ambiente. Desse modo, a exploração da atividade antimicrobiana por meio de compostos presentes em óleos essenciais e no leite de vaca, bem como determinação de dosagens efetivas destes, pode constituir numa forma promissora para o controle de doenças, possibilitando avanços, com a posterior caracterização da forma de ação destes compostos.

Nesse contexto, em trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos a partir de plantas tem sido indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com característica de eliciadores (SCHWAN-ESTRADA, 2003). Assim, Medice et al. (2005) observaram redução na severidade da ferrugem da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, numa faixa situada entre 35% e 61%, com o tratamento preventivo das plantas com óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), tomilho (*Thymus vulgaris*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e nim (*Azadirachta indica*).

O leite de vaca tem sido empregado como forma alternativa de controle de oídios em diferentes culturas. Bizi et al. (2008) observaram uma redução de 36,5% na severidade de oídio (*Oidium* sp.) em mudas de *Eucalyptus benthamii*,

utilizando leite de vaca a 20% em água, sob forte concentração de fonte de inóculo em casa de vegetação.

Considerando o largo conhecimento da atividade antifúngica dos compostos supracitados, este trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar produtos alternativos eficientes no manejo do oídio da soja, verificar a ação desses produtos sobre estruturas do patógeno por meio da análise por microscopia eletrônica de varredura, a fim de possibilitar a posterior elucidação do modo de ação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Departamento de Fitopatologia (DFP), com atividades concentradas em casas de vegetação e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, situada a 960 m de altitude, 44,97° de longitude oeste e 21,22° de latitude sul. O período experimental compreendeu os meses de março de 2009 a junho de 2010.

2.1 Plantio e condução das plantas

Sementes de soja cultivar Conquista (MG/BR-46) foram fornecidas pelo Laboratório de Análise de Patologia de Sementes do DFP/UFLA. Foi realizada a semeadura de cinco sementes por vaso de três litros, contendo o substrato comercial. A irrigação foi efetuada diariamente de forma localizada. Aos cinco dias após a emergência, foi realizada a inoculação de bactérias do gênero *Rhizobium*, por meio da aplicação de 15 mL de solução de turfa contendo uma concentração previamente calibrada para 10^8 células mL⁻¹ de inoculante.

Aos dez dias após a emergência, executou-se o desbaste, deixando apenas as duas plantas de maior vigor em cada vaso.

2.2 Obtenção do inóculo e inoculação de *Erysiphe diffusa*

Plantas de soja da cultivar Conquista, suscetível ao oídio, foram previamente semeadas em 60 vasos, na densidade de quatro plantas por vaso de três litros, com a finalidade de servirem como fonte de inóculo. Posteriormente, realizaram-se pinceladas com conídios de *E. diffusa* obtidos de plantios naturalmente infectados, em plantações experimentais de soja no campus da

UFLA. Estes vasos foram repostos periodicamente, mantendo-se a fonte de inóculo em casa de vegetação separada dos experimentos.

2.2.1 Inoculação das plantas por *E. diffusa*

Para o experimento realizado em casa de vegetação, assim como para o experimento visando o estudo da efetividade de produtos alternativos por meio da microscopia eletrônica de varredura, realizou-se a inoculação por meio de plantas infectadas por *E. diffusa* (fontes de inóculo), por contato direto das plantas infectadas com as plantas do experimento, na proporção de 1:5 (um vaso de fonte de inóculo a cada cinco vasos do experimento).

Para o experimento de avaliação do efeito de óleos essenciais (OE) e leite (LE), na germinação de conídios de *E. diffusa* em folíolos previamente tratados, foi realizada a coleta dos conídios minutos antes da inoculação, os quais foram obtidos a partir de plantas de soja em ativa esporulação, e conservadas em casa de vegetação, com o objetivo de servirem como fonte de inóculo. Assim, os conídios foram coletados com pincel de pintura de cerdas macias e água, as folhas foram pinceladas delicadamente para evitar danos e/ou coleta de conídios muito jovens (imaturos). Posteriormente, os conídios foram depositados num béquer com água destilada esterilizada. Finalmente, foi realizada rapidamente a inoculação dos folíolos, a fim de evitar inibição da germinação dos conídios pela água. Uma alíquota de 5 mL da suspensão de conídios foi separada em cada experimento, para a realização da quantificação da suspensão em câmara de Neubauer.

2.3 Obtenção e preparo dos óleos essenciais, leite e demais padrões utilizados

Os óleos essenciais de canela *Cinnamomum zeylanicum* (CA), capim-limão *Cymbopogon citratus* (CL), citronela *Cymbopogon nardus* (CI), eucalipto *Eucalyptus globulus* (EU) e árvore de chá *Melaleuca altemifolia* (ME), também conhecida como melaleuca, foram adquiridos da marca comercial Brasil Portrait[®]. O leite *in natura* foi adquirido no setor de bovinocultura de leite do Departamento de Zootecnia da UFLA, a partir de um animal isento de ingestão de antibióticos, para evitar possível influência nos resultados.

Os óleos essenciais foram utilizados na concentração de 0,1% (1 mL L⁻¹) em água destilada e dissolvidos pela adição de Tween a 0,1% (v/v), a fim de formar uma emulsão. O tratamento composto de solução de leite (LE) foi preparado pela diluição direta de leite *in natura* em água destilada, ajustando a concentração final para 10%. O fungicida (FU) de princípio ativo tebuconazole (formulação comercial Folicur[®] 200 CE) foi preparado a 1,67 mL L⁻¹. Como padrão de indução de resistência foi utilizado o ativador de plantas Bion[®] (acibenzolar-S-metil, ASM), na dosagem de 0,08g L⁻¹. Foi acrescido, como testemunha (TE), um tratamento utilizando apenas água adicionada de Tween 20 a 0,1% (v/v), além da testemunha absoluta.

2.4 Avaliação do efeito de OE e do LE, na germinação de conídios de *E. diffusa* em folíolos previamente tratados

Os seguintes produtos foram testados na germinação de conídios de *E. diffusa* em folíolos de soja: OE de citronela (CI), capim-limão (CL), eucalipto globulus (EU), canela (CA) e melaleuca (ME), na dose de 1mL L⁻¹ (0,1%) e leite (LE) a 100 mL L⁻¹(10%). Como padrão de inibição, usou-se o fungicida

tebuconazole aplicado como Folicur® 200 CE a $1,67 \text{ mL L}^{-1}$ e, ainda, um tratamento composto pelo padrão de indução de resistência ASM, na concentração de $0,08 \text{ g L}^{-1}$, e outro composto por água destilada adicionada de Tween 20 a 0,1% (TE).

Primeiramente, procedeu-se a semeadura da soja em casa de vegetação livre do inóculo de oídio, em vasos plásticos de 3 L, num total de três vasos por tratamento. Plantas de soja no estágio V4 (terceira folha trifoliada aberta) foram pulverizadas com os produtos mencionados anteriormente. Após 24 horas da aplicação dos produtos, foram coletados 24 folíolos de cada tratamento, utilizando o método de folhas destacadas descrito por Wilcoxson, Atif e Skovmand (1974). Em seguida, foi realizada a inoculação do patógeno por meio da pulverização das folhas com uma suspensão de *E. diffusa* a $1,5 \cdot 10^6$ conídios mL^{-1} e incubados por 4, 8, 12 e 24 horas. Decorridos os tempos de inoculação, foram coletados discos de folíolos, com furador metálico de 110 mm de diâmetro.

Os discos foram processados de acordo com o seguinte protocolo adaptado de Stadnik e Buchenauer (2000): foram acondicionados imediatamente após a coleta em frascos tampados contendo 5 mL da solução saturada de cloral hidratado contendo 5% de ácido acético (v/v) para fixação e clareamento dos tecidos. Finalmente, os discos foram transferidos para placas de Petri estéreis contendo uma solução de lacto glicerol/azul de algodão 1:1 (v/v) para a conservação dos tecidos e coloração das estruturas de *E. diffusa*. Posteriormente, foram montados e observados em microscópio de luz. Foi avaliada a germinação de todos os conídios presentes em cada disco, sendo considerado como germinados todos os conídios com tubo germinativo formado, registrando-se a percentagem de conídios germinados por tratamento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com oito discos para cada tratamento perfazendo oito repetições.

2.5 Avaliação e seleção de produtos compostos por OE e LE por meio de experimento em casa de vegetação utilizando plantas de soja infectadas por *E. diffusa*

Com o propósito de avaliar e selecionar produtos promissores no controle curativo do oídio da soja, os seguintes produtos foram testados na aplicação curativa em plantas de soja sob condições de casa de vegetação: óleos essenciais de citronela (CI), capim-limão (CL), eucalipto globulus (EU), canela (CA) e melaleuca (ME), na dose de 1 mL L^{-1} (0,1%) e leite (LE) a 100 mL L^{-1} (10%). Como padrão de inibição, utilizou-se o fungicida tebuconazole aplicado como Folicur[®] 200 CE a $1,67 \text{ mL L}^{-1}$, além da testemunha inoculada e absoluta. Todos os tratamentos foram diluídos em água destilada, tendo os compostos por óleo essencial sido adicionados de Tween 20 (1 mL L^{-1}). Após a semeadura de soja cv. Conquista em vasos de três litros contendo substrato comercial, na densidade de duas plantas por vaso, procedeu-se à inoculação das plantas aos 10 DAE, por meio do contato direto de plantas infectadas com as plantas do bioensaio.

Aos 20 dias após inoculação (DAI), foi realizada a primeira aplicação dos tratamentos, mediante pulverização foliar até ponto de escorrimento, utilizando pulverizadores manuais de 0,5 L. Nova pulverização foi realizada 50 DAI. A avaliação da severidade foi realizada a cada dez dias em todos os folíolos de cada planta constituinte da parcela experimental, pelo uso da escala diagramática para percentagem de área foliar afetada por oídio do feijoeiro comum (Azevedo, 1997), adaptando-a para a soja. Foi realizado um total de cinco avaliações, iniciando aos 20 DAI. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por dois vasos.

2.6 Estudo da efetividade de produtos alternativos contra *E. diffusa*, por meio da microscopia eletrônica de varredura em folíolos submetidos ao tratamento curativo

Para observar a efetividade do leite e óleos essenciais sobre a morfologia das estruturas *Erysiphe diffusa* por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura, foram utilizados os mesmos tratamentos do primeiro experimento. Desse modo, primeiramente, foi realizada a semeadura de soja, na densidade de duas plantas por vaso, em vasos de três litros contendo substrato comercial Plantmax HT. Aos dez dias após a emergência (DAE), foi realizada a inoculação das plantas por *E. diffusa*, por meio do contato direto entre plantas infectadas e plantas da parcela experimental, na proporção de um vaso de fonte de inóculo a cada cinco vasos da parcela experimental. Foram conduzidos, no total, 60 vasos. Posteriormente, foi utilizado o método da folha destacada, técnica empregada em muitos estudos envolvendo relações patógeno-hospedeiro com parasitas obrigatórios, utilizando folhas ou pedaços de folhas (WILCOXSON; ATIF; SKOVMAND, 1974). Assim, no estágio R2, foram coletados seis folíolos de soja, selecionando-os conforme uniformidade de sintomas do oídio.

Os folíolos foram separados em número de seis para cada tratamento aplicado e acondicionados em bandejas plásticas desinfestadas. Os tratamentos foram aplicados nas folhas infectadas por *E. diffusa* por meio de um pulverizador manual. As bandejas foram envoltas com saco plástico transparente e levadas à câmara de crescimento, à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas. Posteriormente, as bandejas foram retiradas da câmara de crescimento e coletaram-se amostras para análise em microscópio eletrônico de varredura, conforme metodologia de Bossola e Russell (1998), adaptada por Pereira (2008). A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40, com tensão aceleradora de 15 kV.

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada utilizando-se o software estatístico Sisvar[®]. Para o experimento realizado a fim de avaliar o efeito de OE e de LE, na germinação de conídios de *E. diffusa* em folíolos previamente tratados, os dados obtidos da percentagem de conídios germinados de cada tratamento foram submetidos à análise estatística, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para o experimento realizado sob condições de casa de vegetação, após a obtenção dos dados da severidade do oídio da soja (coletado nas avaliações do experimento), foi calculada, para cada tratamento, a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), proposta por Shaner e Finney (1977).

Posteriormente, as áreas obtidas de cada tratamento foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com o objetivo de identificar quais tratamentos foram mais efetivos no controle da severidade do oídio da soja.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada no teste de germinação em folíolos de soja, com a adaptação do protocolo de descoloração do limbo foliar proposto por Stadnik e Buchenauer (2000), mostrou-se promissora para o estudo do patossistema soja-*E. diffusa*. No entanto, no que diz respeito à inoculação dos folíolos, algumas adaptações foram realizadas em relação à técnica convencional, devido à natureza do patógeno de não suportar longos períodos de exposição sob alta pressão osmótica, para aprimoramento do experimento, que foi repetido por duas vezes para a confirmação dos resultados.

A germinação de conídios de *E. diffusa* ocorreu somente 12 horas após a inoculação pela suspensão de conídios. Folíolos tratados apenas com água adicionada de Tween 20 a 0,1% (TE) apresentaram alta percentagem de germinação e tubos germinativos bem desenvolvidos, com eventuais formações de haustórios. Maior percentagem de germinação de conídios foi observada nos tratamentos constituídos por óleos essenciais EU e CI, juntamente com ASM, os quais apresentaram baixa inibição da germinação, superando somente o tratamento onde os folíolos foram pulverizados com água (TE) (Gráfico 1).

Esses resultados diferem dos obtidos por Medice et al. (2005) que verificaram que o óleo essencial de citronela inibiu totalmente a germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd; P.Syd., agente etiológico da ferrugem-asiática-da-soja. Os dados diferem também das observações de Carvalho et al. (2008), que notaram que o extrato bruto de capim-limão não inibiu a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Quanto ao tratamento composto por leite (LE), Bettiol (2001 citado por BETTIOL; SILVA; REIS, 2008), observou que o estímulo de microrganismos como bactérias do filoplano de plantas da família cucurbitaceae pulverizadas com leite favorece o desenvolvimento de fungos como *Cladosporium* e *Fusarium*, favorecendo a

atividade de caráter preventivo por parte do LE, mas não afeta a germinação ou a penetração de conídios nas folhas. No entanto, os tratamentos compostos por OE de capim-limão (CL), canela (CA) e melaleuca (ME), juntamente com o tratamento constituído pelo próprio leite (LE), apresentaram redução mais pronunciada na germinação em relação aos demais tratamentos utilizados compostos por OE. Por outro lado, apesar da diferença estatística entre os tratamentos, em termos numéricos nota-se que a redução na percentagem da germinação por parte desses produtos foi notadamente inferior, quando comparada ao tratamento composto pelo fungicida tebuconazole. Tal fato evidencia uma possível ação predominantemente preventiva por indução de resistência das plantas ao patógeno por parte destes produtos nas plantas, observada a propriedade sugerida por Kuc (2001), em que produtos que têm ação de indução de resistência, normalmente, não têm efeito direto pronunciado sobre a germinação de conídios. Entretanto, ao induzir a resistência na planta afetam a colonização por parte do patógeno. Outro fato a ser considerado é o de que, ao realizar a aplicação prévia dos produtos, sem haver contato direto do produto com as estruturas de *E. diffusa*, pode ser que não houve tempo hábil para a formação de barreiras estruturais e/ou bioquímicas contra o patógeno e, ainda que essas ocorressem, não haveria influência na germinação do patógeno.

Desse modo, sugere-se que os óleos essenciais de Ci e CL, bem como o LE, apresentam maior efeito residual direto que os outros produtos compostos por OE testados.

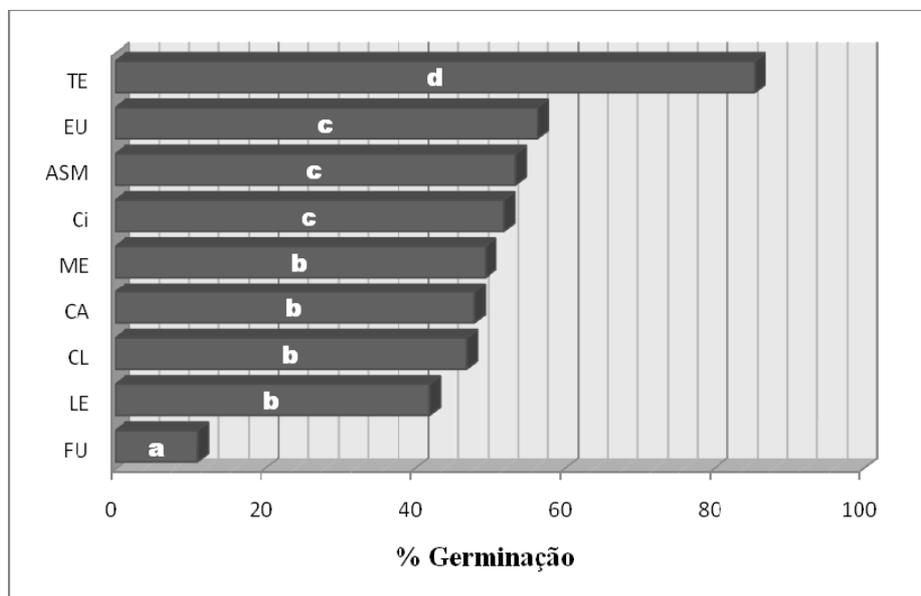


Gráfico 1 Percentagem de germinação de conídios de *Erysiphe diffusa* submetidos à aplicação preventiva de produtos alternativos. FU - fungicida tebuconazole; CI- óleo essencial de citronela; LE-solução de leite; CL-óleo essencial de capim limão; EU- óleo essencial de Eucalipto; CA- óleo essencial de canela; ME – óleo essencial de melaleuca; ASM - acibenzolar-S-metil TE-testemunha. Áreas seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

3.1 Avaliação e seleção de produtos compostos por OE e LE por meio de experimento em casa de vegetação usando plantas de soja infectadas por *E. diffusa*

Foram observadas áreas abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPSD), menores estatisticamente que a testemunha para todos os tratamentos testados em aplicação curativa (Gráfico 2) em relação à testemunha (TE). Tal fato revela um bom controle do oídio da soja tanto pelos óleos essenciais (OE) como pelo LE. As plantas tratadas com o fungicida tebuconazole, OE de citronela (CI), capim-limão (CL), eucalipto (EU) e leite (LE) apresentaram mesmo nível de controle, não diferindo entre si pelo teste de

Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Em seguida, observou-se uma redução intermediária por parte dos tratamentos compostos por OE de canela (CA) e melaleuca (ME).

Abreu (2006) observou redução de 26%, 62% e 95% na incidência da pinta-preta (*Alternaria solani*) do tomateiro em plantas tratadas com OE de canela, nas concentrações de 0,5; 0,75 e 5 mL L⁻¹, respectivamente. De forma análoga, Itako et al. (2008) encontraram resultados promissores no controle da mesma doença ao usar o extrato de capim-limão a 20%, demonstrando, inclusive, um efeito sistêmico, com redução no número de lesões em folhas localizadas acima das folhas tratadas.

Em relação ao tratamento composto por LE, o qual, juntamente com o tratamento composto pelo OE de citronela, promoveu maior redução numérica no progresso da severidade da doença, pode-se citar a semelhança com o estudo realizado por Ferrandino e Smith (2007). Estes autores, ao compararem o efeito de leite integral, leite desnatado e bicarbonato de sódio na capacidade de redução do oídio em abóbora, observaram que o leite desnatado não foi tão eficiente quanto o leite integral e, ainda, que os tratamentos compostos por leite superaram o tratamento composto por bicarbonato de sódio. Muito embora Bettiol, Silva e Reis (2008) tenham observado certa atividade na redução do progresso de oídio em plantas de abobrinha e pepino, usando parte do componente do LE denominada soro de leite nas concentrações de 25% a 30%, quando comparada à redução propiciada pelo LE comparada por Medeiros (2006), esse componente não superou o tratamento no qual se utilizou o LE.

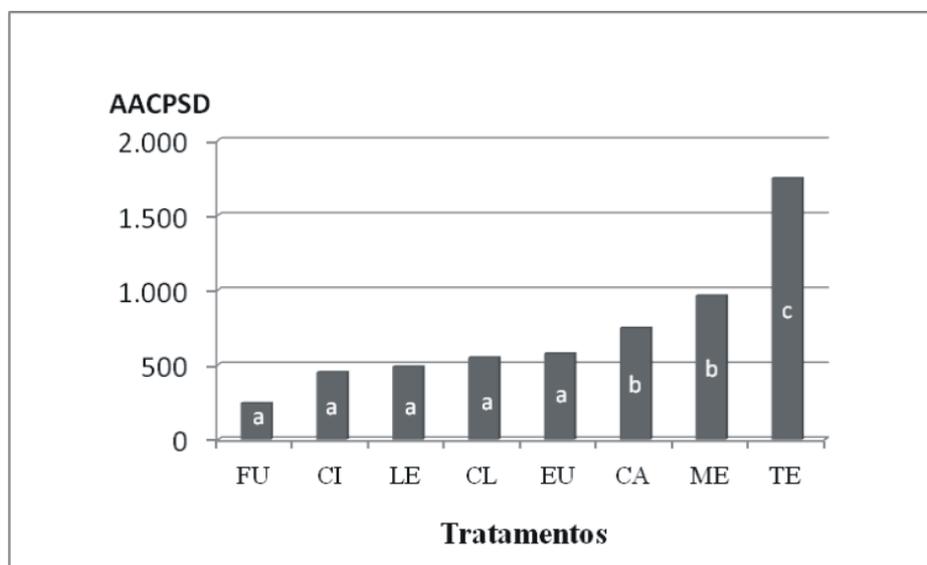


Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso de severidade de oídio em plantas de soja submetidas a aplicação de produtos alternativos. FU- fungicida tebuconazole; CI- óleo essencial de citronela; LE - solução de leite; CL- óleo essencial de capim-limão; EU - óleo essencial de eucalipto; CA - óleo essencial de canela; ME - óleo essencial de árvore de chá; TE - testemunha. Áreas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Já os tratamentos compostos por OE de canela e árvore de chá, apesar de apresentarem efetividade na redução da severidade da doença, mostraram resultados inferiores, quando comparados aos demais tratamentos, embora tenham apresentado superioridade às plantas sem tratamento (TE), pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Este dado revela a menor atividade por parte desses produtos contra o referido fungo.

Em relação à percentagem de redução da severidade da doença, foi possível constatar, de acordo com a gráfico 3, que os tratamentos FU, CI, LE, CL, EU, CA e ME apresentaram redução de 86,1%, 74,2%, 72,1%, 68,7%, 67,1%, 57,3%, e 44,9%, respectivamente. Esses resultados na redução severidade da doença em soja se assemelham aos obtidos por Medice et al.

(2005) que observaram redução na severidade da ferrugem-asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) de 53,18%, 34,59%, 48,88% e 60,75%, em plantas tratadas com óleo essencial de eucalipto citriodora, citronela, nim e tomilho, respectivamente.

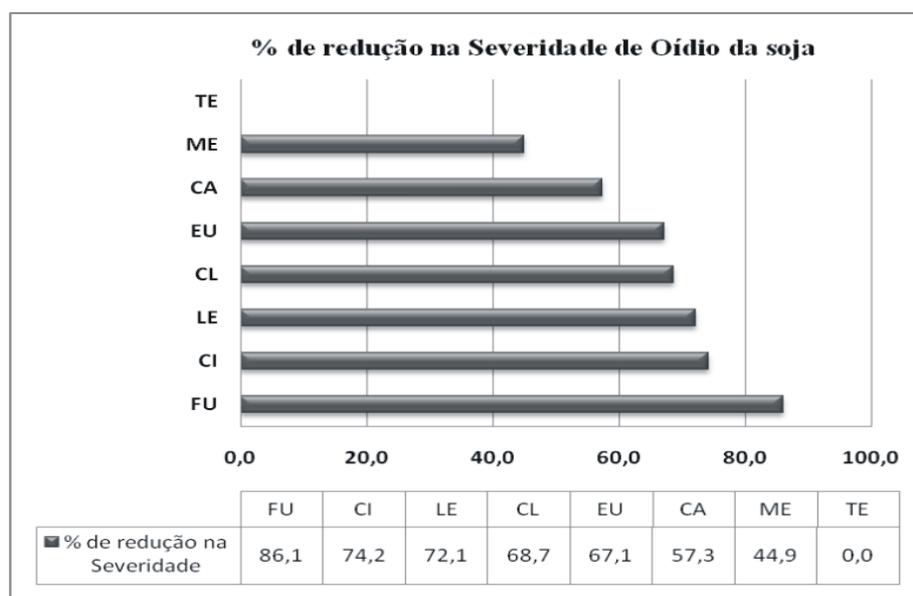


Gráfico 3 Percentagem de redução na severidade de oídio em plantas de soja submetidas a aplicação de produtos alternativos. FU fungicida Tebuconazole; CI óleo essencial de citronela; LE solução de leite; CL óleo essencial de capim-limão; EU óleo essencial de eucalipto; CA óleo essencial de canela; ME- óleo essencial de melaleuca; TE- testemunha

Assim, foram pré-selecionados os tratamentos compostos por OE de citronela (CI), capim-limão (CL) e leite (LE) para a realização de experimentos posteriores, por se destacarem em relação aos demais produtos testados.

3.2 Estudo da efetividade de produtos alternativos contra *E. diffusa*, por meio da microscopia eletrônica de varredura, em folíolos submetidos ao tratamento curativo

Nas observações realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Figura 1), pode-se constatar que, em folíolos tratados apenas com água destilada (Figura 1A), a morfologia das estruturas de *E. diffusa* apresentaram-se intactas e bem desenvolvidas. Abundante quantidade de hifas, formando densa camada de micélio fúngico e esporos, pode ser detectada, quando comparada aos tratamentos compostos por óleos essenciais de citronela (Figura 1B), capim-limão (Figura 1C), canela (Figura 1D), eucalipto (Figura 1E), melaleuca (Figura 1F), leite (Figura 1G) e tebuconazole (Figura 1H). Foi observado efeito direto sobre os conídios de *E. diffusa*, provocando extravasamento celular e perda de turgescência.

Efeito semelhante foi detectado nas hifas de *E. diffusa*, com evidente degeneração e perda de turgescência, e conseqüente redução no crescimento micelial na epiderme dos folíolos de soja. Tal fato foi observado na maioria dos tratamentos utilizados, incluindo os folíolos tratados, com exceção, apenas, do tratamento composto por óleo essencial de melaleuca, que apresentou apenas efeito sobre os conídios de *E. diffusa* (Figura 1F).

Resultados obtidos por Zambonelli et al. (1996), ao testarem o efeito de óleo essencial de tomilho, também demonstraram degeneração de hifas e o extravasamento celular de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*. De forma análoga, Medice et al. (2005), ao utilizarem a MEV no estudo dos óleos essenciais aplicados a folíolos de soja infectados por *P. pachyrhizi*, também evidenciaram, em seus registros, a murcha de urediniósporos. Já Pereira et al. (2008), ao estudarem o efeito da aplicação de óleo essencial de tomilho e

extrato de casca de café sobre *Cercospora coffeicola* em folhas de cafeeiro, observaram redução na germinação de conídios, 48 horas após a inoculação.

Crisp et al. (2006) também observaram fato semelhante com a aplicação de soro de leite sobre oídio da videira (*Uncinula necator*), constatando que este produto causou colapso de hifas e modificação da aparência de conídios. Por outro lado, Medeiros (2006), ao estudarem o mecanismo de ação e atividades de frações do leite no controle do oídio da abobrinha, verificaram a formação de um filme na superfície de folhas tratadas com leite, estimulando o aumento da população bacteriana epifítica e que estas eram capazes de suprimir o patógeno. E ainda, Ferrandino e Smith (2007), ao compararem o efeito de leite integral, leite desnatado e bicarbonato de sódio na capacidade de redução do oídio em abóbora, constataram que tratamentos compostos por leite superaram o tratamento composto por bicarbonato de sódio, indicando que o controle do fungo pelo leite não se deu somente pela habilidade de tamponamento da superfície foliar. No entanto, quanto ao efeito de solução de leite sobre fitopatógenos, ao que parece, este é o primeiro registro da ação direta desse produto sobre agentes fitopatogênicos pelo uso da MEV.

Em última análise, cabe ressaltar que os resultados obtidos através da MEV corroboram os dados obtidos no experimento inicial conduzido em casa de vegetação, em que o tratamento composto pelo óleo essencial de melaleuca apresentou menor ação sob as estruturas de *E. diffusa*. De forma análoga, o mesmo tratamento apresentou menor efeito na redução da severidade da doença quando comparado aos demais tratamentos. No entanto, para o tratamento composto por óleo essencial de canela, apesar da efetividade observada através da MEV, o mesmo apresentou menor redução na severidade da doença. Todavia, estes tratamentos apresentaram atividade intermediária contra *E. diffusa*.

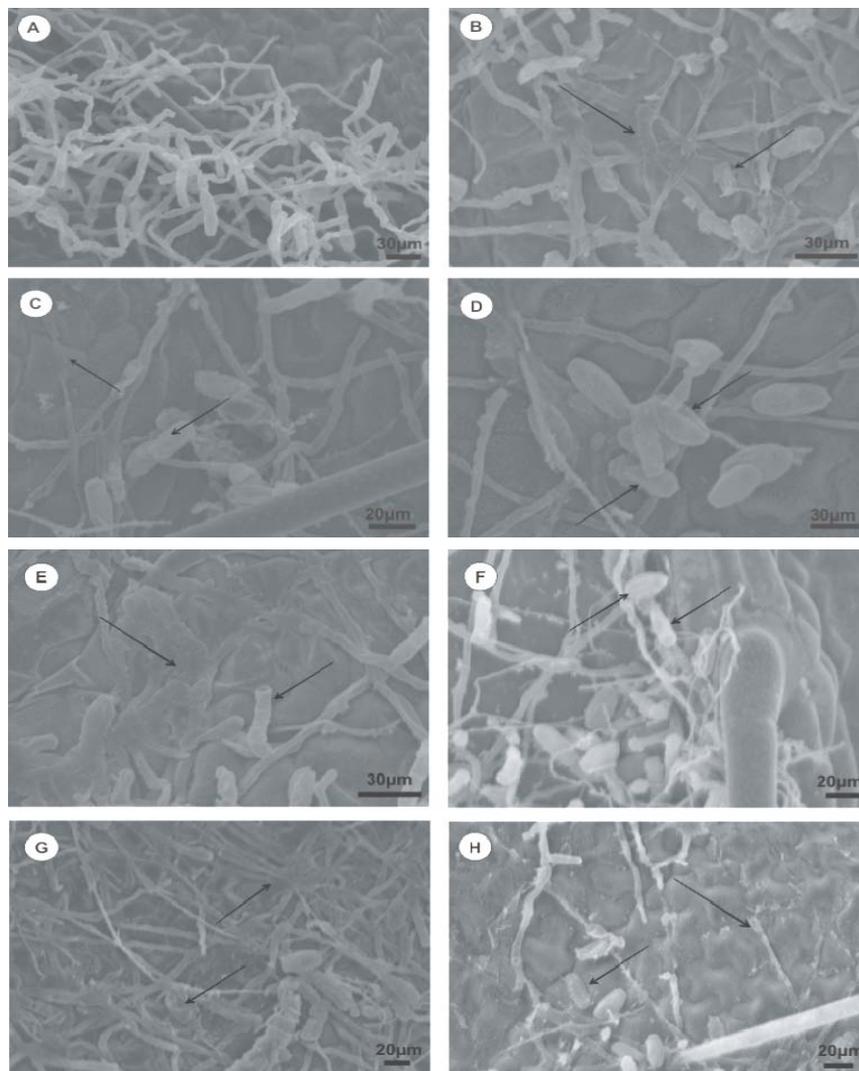


Figura 1 Eletromicrografias de varredura em folíolos de soja infectados por *E.diffusa* e tratados com produtos alternativos. Tratamentos constituídos por: água destilada (A), óleos essenciais de citronela (B), capim-limão (C), canela (D), eucalipto (E) e árvore de chá (F), leite (G) e Tebuconazole (H). Setas indicam o extravasamento de hifas e perda do conteúdo celular em conídios.

4 CONCLUSÕES

Os OEs de capim-limão (CL) e citronela (Ci), junto do leite de vaca *in natura* (LE), foram selecionados por apresentarem efetividade superior à dos demais tratamentos testados. Estes produtos apresentam efeito direto sobre as estruturas de *E. diffusa* e consistem em alternativas promissoras para a aplicação em cultivos orgânicos

REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. M. **Controle de alternaria solani em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Brasil supera EUA no consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ande.com.br/informativo/ande.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.

ALMEIDA, A. M. et al. Caracterização de isolados de oídio de soja, feijão, girassol e plantas daninhas no Brasil usando sequências de rDNA-ITS. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 21-26, fev. 2008.

AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: [s. n.], 1997. 114 p.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Controle alternativo de pragas e doenças. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. p.163-183.

BETTIOL, W.; SILVA, H. S. A.; REIS, R. C. Effectiveness of whey against zucchini squash and cucumber powdery mildew. **Scientia Horticulturae**, Matieland, v. 117, n. 1, p. 82-84, June 2008.

BIZI, R. M. et al. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 144-148, jan. 2008.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. Phylogeny of Erysiphe, Microsphaera, Uncinula (Erysipheae) and Cystotheca, Podosphaera, Sphaerotheca (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, Garten, v. 4. n. 1, p. 1-33, Feb. 2000.

CARVALHO, J. B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 88-93, ago. 2008.

CRISP, P. et al. Sustainable control of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ORGANIC WINE GROWING, 1., 2004, Stugart. **Abstract guide...** Stugart: Organic Europe, 2004. p. 47-52.

FERRANDINO, F. J.; SMITH, V. L. The effect of milk-based foliar sprays on yield components of field pumpkins with powdery mildew **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 657-663, Apr. 2007.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul: APS, 1999. 104 p.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 241-244, May/June 2008.

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

MEDEIROS, F. H. V. **Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha**. 2006. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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. 2005.

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. 1287-1296, out. 2008.

SANTOS, A. P. **Controle do oídio da abobrinha com antagonistas e produtos biocompatíveis**. 2009. 55 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SARTORATO, A.; YORINORI, J. T. Oídio de leguminosas: feijoeiro e soja. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Org.). **Oídios**. Campinas: Emopi, 2001. v. 1, p. 255-285.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: USP, 2003. p. 147.

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

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 25-34, July 2000.

WILCOXSON, R. D.; ATIF, A. H.; SKOVMAND, B. Slow rusting of wheat varieties in the field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 58, n. 4, p. 1085-1087, Feb. 1974.

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

CAPÍTULO 3

Óleos essenciais e leite no controle do oídio da soja: modo de ação

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o propósito de avaliar a efetividade e de elucidar o modo de ação de produtos alternativos promissores compostos pela combinação entre óleos essenciais (OE) e solução de leite de vaca *in natura* (LE). Foram realizados quatro experimentos: dois sob condições de casa de vegetação para determinar a capacidade curativa e preventiva da combinação entre OE e LE na redução do progresso da severidade do oídio da soja; um para a análise morfológica de folíolos de soja infectados por *E. diffusa* e submetidos ao tratamento curativo e preventivo utilizando o tratamento mais efetivo e, finalmente, um experimento para a caracterização de possíveis mecanismos bioquímicos envolvidos numa possível resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não com os produtos alternativos efetivos contra *E. diffusa*. A combinação entre OE de capim-limão (CL) a 1 mL L⁻¹ e LE a 5 mL L⁻¹ apresentou a maior redução no progresso da severidade do oídio da soja tanto no ensaio para verificação da atividade curativa como preventiva, mesmo quando a dosagem de ambos os produtos foi reduzida pela metade, quando da aplicação desse produto em combinação. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura revelou forte efeito direto em folíolos tratados pelo método curativo e aumento da formação de apressórios numa provável tentativa de superar a dificuldade de penetração imposta pela aplicação preventiva desse produto nos folíolos. O experimento para caracterização bioquímica revelou forte atividade de indução de resistência com aumento da atividade de enzimas envolvidas na ativação de respostas de defesa das plantas de soja contra *E. diffusa*. O produto alternativo (CL LE)/2 apresentou modo de ação curativo com efeito direto sobre o patógeno e preventivo como indutor de resistência das plantas.

Palavras-chave: *Erysiphe diffusa*. *Glycine max*. Controle alternativo de doenças de plantas. Indução de resistência.

ABSTRACT

The present work has as purpose: to evaluate the effectiveness and elucidate the mode of action of promising alternative products composed by essential oils (OE) and a solution of whole cow milk (LE). Were made four experiments: two experiments under greenhouse conditions to determine the curative and preventive combination between OEs and LE on the reduction of the severity of powdery mildew of soybean; An experiment for morphological analysis of leaf area infected by *E. diffusa* and submitted to curative and preventive treatment using the most effective treatment; And finally, an experiment for the characterization of possible biochemical mechanisms involved in a possible defense response induced in soybean plants treated or not with the alternative products effective against *E. diffusa*. The combination of OE of lemon grass (CL) at 1 mL L⁻¹ and LE 5 mL L⁻¹ showed the greatest reduction in the progress and severity of powdery mildew of soybean test to verify both the curative and preventive activity, even when the dosage of both products was reduced by half, when applying this product in combination. Morphological analysis by scanning electron microscopy revealed a strong direct effect on leaflets treated by curative and increased formation of appressoria in a probable attempt to overcome the difficulty imposed by the penetration of preventive application of this product in the leaflets. The study on the biochemical characterization revealed strong activity in inducing resistance with increased activity of enzymes involved in activation of defense responses of soybean plants against *E. diffusa*. The alternative product (CL LE) / 2 showed curative mode of action with a direct effect on the pathogen and preventive as inducer of resistance in plants.

Index terms: *Erysiphe diffusa*. Glycine max. Alternative control of plant diseases. Resistance induction.

1 INTRODUÇÃO

O oídio da soja tem como agente causal o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* (BRAUN; TAKAMATSU, 2000) e passou a ser uma doença preocupante após grande surto, na safra de 1996/1997, em todas as áreas cultivadas da região dos Cerrados do Brasil Central ao Rio Grande do Sul. Desde então, essa doença passou a ser uma ameaça constante aos agricultores, com perdas relatadas de até 25% (ALMEIDA et al., 2008).

O uso de cultivares resistentes consiste no método de controle mais eficiente para esta doença, porém, devido à grande variabilidade patogênica de *E. diffusa*, algumas cultivares podem ter a resistência “quebrada” pelo patógeno. Assim cabe aos produtores a adoção de práticas culturais que reduzam o inóculo inicial desse patógeno na lavoura (YORINORI et al., 1993), o que tem sido feito pelo uso de fungicidas sistêmicos. O uso racional desses produtos tem efeito benéfico para os produtores em curto prazo. No entanto, em longo prazo, pode ocorrer a seleção de raças resistentes do patógeno, considerando a elevada variabilidade de *E. diffusa*, além dos problemas ocasionais de contaminação do homem e do ambiente. Estes problemas são de relevante importância, uma vez que o Brasil ocupa a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF, 2009).

Em decorrência disso, tem-se, na agricultura alternativa, a filosofia da busca de medidas efetivas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (ZADOKS, 1992).

Assim sendo, os óleos essenciais (OE) têm sido largamente estudados no manejo alternativo de doenças de plantas; já o leite de vaca *in natura* tem sido estudado por apresentar atividade comprovada sobre oídios. Esses produtos consistem em boa alternativa aos produtores de alimentos orgânicos, além de serem produtos com ingredientes ativos passíveis de serem explorados visando

posterior síntese em laboratório. Na literatura, há uma infinidade de trabalhos desenvolvidos com óleo essencial obtido a partir de plantas e que indicam o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de fitoalexinas, sugerindo a presença de compostos com característica de eliciadores, segundo observou Schwan-Estrada (2003).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a efetividade e elucidar o modo de ação de produtos alternativos promissores compostos pela combinação entre óleos essenciais (OE) e solução de leite de vaca *in natura* (LE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Departamento de Fitopatologia (DFP), com atividades concentradas em casas de vegetação e nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) e Fisiologia do Parasitismo, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em cidade de Lavras, MG, a 960 m de altitude, nas coordenadas 44,97° de longitude oeste e 21,22° de latitude sul. O período experimental foi de março de 2009 a julho de 2010.

2.1 Plantio e condução das plantas

Sementes de soja cultivar Conquista (MG/BR-46) foram fornecidas pelo Laboratório de Análise de Patologia de Sementes do DFP/UFLA. Foi realizada a semeadura de cinco sementes por vaso de três litros, contendo o substrato comercial. A irrigação foi efetuada diariamente de forma localizada. Aos cinco dias após a emergência, foi realizada a inoculação de bactérias do gênero *Rhizobium*, por meio da aplicação de 15 mL de solução de turfa contendo uma concentração previamente calibrada para 10^8 células mL⁻¹ de inoculante.

Aos dez dias após a emergência, executou-se o desbaste, deixando apenas as duas plantas de maior vigor em cada vaso.

2.2 Obtenção do inóculo e inoculação das plantas por *Erysiphe diffusa*

Plantas de soja da cultivar Conquista, suscetível ao oídio, foram previamente plantadas em 60 vasos, na densidade de quatro plantas por vaso de

três litros, com a finalidade de servirem como fonte de inóculo. Posteriormente, realizaram-se pinceladas com conídios de *E. diffusa*, obtidos de plantios naturalmente infectados, em plantações experimentais de soja no campus da Universidade Federal de Lavras. Estes vasos foram repostos periodicamente, mantendo-se a fonte de inóculo em uma casa de vegetação separada dos experimentos.

A inoculação das plantas dos experimentos foi realizada de duas formas diferentes, as quais estão descritas a seguir, conforme a peculiaridade de cada experimento.

2.2.1 Inoculação das plantas para o experimento de avaliação do efeito curativo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja

Para esse experimento, foi procedida a inoculação por meio do uso de plantas infectadas por *E. diffusa* (fontes de inóculo), por contato direto das plantas infectadas com as plantas do experimento, na proporção de 1:5 (um vaso de fonte de inóculo a cada cinco vasos do experimento).

2.2.2 Inoculação das plantas para o estudo do efeito na severidade do oídio da soja em plantas submetidas ao tratamento preventivo e estudo bioquímico de plantas tratadas previamente

Foi efetuada a coleta dos conídios de *E. diffusa* minutos antes da inoculação, os quais foram obtidos a partir de plantas de soja com sintomas do oídio, a partir de colônias em ativa esporulação. Os conídios foram coletados com pincel de pintura de cerdas macias na ausência de água e as folhas foram pinceladas delicadamente para evitar danos e/ou coleta de conídios muito jovens

(imaturos). Posteriormente, os conídios foram depositados num béquer com água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 a 0,1% (v/v). Finalmente, foi procedida rapidamente a inoculação das plantas, a fim de evitar inibição da germinação dos conídios pela água. Uma alíquota de 5 mL da suspensão de conídios foi separada em cada experimento, para a realização da quantificação da suspensão em câmara de Neubauer.

2.3 Obtenção e preparo dos óleos essenciais, leite e demais produtos utilizados

Os óleos essenciais (OE) de capim-limão *Cymbopogon citratus* (CL) e citronela *Cymbopogon nardus*, foram adquiridos da marca comercial Brasil Portrait[®]. O leite de vaca *in natura* foi adquirido no setor de Bovinocultura de Leite, do Departamento de Zootecnia da UFLA, a partir de um animal isento de ingestão de antibióticos, para evitar possível influência nos resultados.

Os óleos essenciais foram utilizados na concentração de 0,1% (1 mL L^{-1}) em água destilada e dissolvidos pela adição de Tween a 0,1% (v/v), a fim de formar uma emulsão. O tratamento composto de solução de leite (LE) foi preparado por meio da diluição direta de leite *in natura* em água destilada, ajustando-se a concentração final para 10%. O fungicida (FU), cujo princípio ativo é tebuconazole (formulação comercial Folicur 200 CE), foi preparado a $1,67 \text{ mL L}^{-1}$. Como padrão de indução de resistência indutor abiótico, utilizou-se o ativador de plantas Bion[®] (acibenzolar-S-metil - ASM), na dose de $0,08 \text{ g L}^{-1}$.

2.4 Efeito curativo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja

Foi realizado um experimento, sob condições de casa de vegetação, a fim de verificar o efeito curativo dos óleos essenciais (OE) e leite (LE), selecionados a partir dos experimentos anteriores, conforme sua efetividade na redução da severidade do oídio em plantas de soja. Os produtos selecionados foram: óleo essencial de capim-limão (CL) e citronela (Ci) e solução de leite (LE). Testaram-se combinações entre óleos essenciais na concentração usual (0,1%) denominado como (Ci CL) e com 50% de redução na concentração, denominado (Ci CL) $_{1/2}$, combinações entre óleos essenciais e leite em concentração usual (Ci LE), (CL LE) e com 50% de redução na concentração (Ci LE) $_{1/2}$ e (CL LE) $_{1/2}$, sobre o controle curativo do oídio da soja. A inoculação foi realizada utilizando-se o método do contato direto entre plantas infectadas por *E. diffusa*, aos 10 dias após a emergência (DAE).

Posteriormente, aos 25 DAE, foram pulverizados os OE de CL e Ci, na concentração de 0,1% (1 mL L⁻¹), denominados CL e Ci e 0,05% (0,5 mL L⁻¹), denominados CL (1/2) e Ci (1/2), utilizados como padrão de 50% de redução nas concentrações feitas em combinações, ambos adicionados de 0,1% de Tween 20; leite (LE) na concentração de 10% (denominado LE) e 5% (denominado LE (1/2)); combinações entre os óleos essenciais: Ci CL a 0,1% e (Ci CL) $_{1/2}$ a 0,05% (0,5 mL L⁻¹) cada óleo (representando 50% da concentração de cada óleo essencial) em água, também adicionados de 0,1% de Tween 20; combinações entre óleos e leite (Ci LE), (CL LE), na concentração de 0,1% (1 mL L⁻¹), para os óleos essenciais e 10% (10 mL L⁻¹) para o leite, ambos em água adicionada de 0,1% de Tween 20; os tratamentos denominados (Ci LE) $_{1/2}$ e (CL LE) $_{1/2}$ representando a combinação de leite e óleos essenciais com 50% de redução na concentração (0,05% para os óleos essenciais e 5% para o leite) e, como padrão

de inibição do progresso da doença, utilizou-se o fungicida (FU) tebuconazole, aplicado como Folicur[®] 200 CE a 1,67 mL L⁻¹. Nova pulverização dos tratamentos foi realizada aos 40 DAE, ou seja, 15 dias após a primeira aplicação.

Aos 25 DAE, foi realizada a primeira avaliação de severidade da doença, com base em escala diagramática da percentagem da área foliar afetada pelo oídio, em feijoeiro comum (AZEVEDO, 1997), adaptando-a para o oídio da soja. Em seguida, mais quatro avaliações foram realizadas semanalmente. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por quatro plantas.

2.5 Efeito preventivo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja

Para estudar o efeito preventivo dos produtos compostos por OE e LE selecionados nos experimentos iniciais, foi conduzido um novo experimento em casa de vegetação. Assim, foram testados os seguintes produtos: OE de citronela (Ci) e capim-limão (CL), ambos na concentração usual de 0,1%, combinação entre estes dois OEs na concentração usual e com 50% de redução na concentração seguindo a metodologia do item anterior. LE na concentração usual e respectivas combinações entre cada OE com o LE, incluindo concentração usual e redução de ambos os produtos combinados a 50%. Foi utilizado como controle positivo o indutor abiótico de resistência Bion[®] (acibenzolar-S-metil ou ASM) a 0,08g L⁻¹, além da testemunha absoluta, como descrito no item anterior.

Aos 25 dias após a emergência (DAE), foi realizada a pulverização das plantas com os tratamentos selecionados e o inóculo ocorreu aos sete dias após o tratamento das plantas, por meio da pulverização de uma suspensão, a 5,0 x10⁶ conídios mL⁻¹ de *E. diffusa*.

Aos 15 dias após a inoculação das plantas, foi realizada a primeira avaliação de severidade da doença, seguida por mais quatro avaliações semanais, conforme descrito no item anterior. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por quatro plantas.

2.6 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folíolos de soja submetidos ao tratamento curativo e preventivo pela combinação de OE de CL e LE

Para a verificação do efeito ocasionado pela aplicação curativa e/ou preventiva do produto composto pela combinação de OE de CL e LE, aos 30 dias após a inoculação das plantas (DAI), tanto no experimento para a verificação do efeito curativo como para o experimento para a verificação do efeito preventivo, realizaram-se coletas de doze folíolos do tratamento composto pela combinação de OE de CL e LE a 0,1% e 10%, respectivamente, selecionados como produtos efetivos entre os analisados nos experimentos anteriores, os quais foram aplicados aos dez dias após a inoculação (efeito curativo) e aos sete dias antes da inoculação (efeito preventivo). Realizaram-se, ainda, coletas dos padrões positivos de inibição composto pelo fungicida Tebuconazole a $1,67 \text{ mL L}^{-1}$ (verificação do efeito curativo) e pelo ASM, na dosagem de $0,08 \text{ g L}^{-1}$ (verificação do efeito preventivo), além de duas testemunhas compostas pela aplicação de água adicionada de Tween 20 a 0,1%, sendo uma para o experimento de verificação do efeito curativo e outra para a verificação do efeito preventivo.

As coletas para os tratamentos compostos pela combinação de produtos (OE de CL e LE) foram procedidas por meio da realização de cortes de fragmentos de $0,5 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$, visando tanto áreas onde havia a formação de halos arroxeados circundando o emaranhado micelial, como áreas que

apresentavam abundante emaranhado micelial de *E. diffusa*, a fim de verificar possível alterações morfológicas no tecido foliar e também nas estruturas do fungo. Para os outros tratamentos, nos quais não houve a formação destes halos arroxeados, foram realizados cortes de fragmentos de 0,5 mm X 10 mm, em áreas que apresentavam somente abundante emaranhado micelial.

Após a realização dos cortes, as amostras foram processadas para a análise em microscópio eletrônico de varredura, conforme metodologia de Bossola e Russell (1998), adaptada por Pereira et al. (2008). A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40, com tensão aceleradora de 20 kV.

2.7 Caracterização dos mecanismos bioquímicos (peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase) envolvidos na resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não com os produtos alternativos efetivos contra *E. diffusa*

Foram utilizadas plantas de soja em estágio V2, cultivadas conforme o item 3.1. Os tempos de coleta das amostras foliares foram: 0 hora, 24 horas (1 dia), 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias), 144 horas (6 dias), 168 horas (7 dias) e 192 horas (8 dias), 240 horas (10 dias) e 288 horas (12 dias) após a aplicação dos tratamentos. Foram utilizadas três repetições com parcela constituída de duas plantas, por tempo de coleta em cada tratamento.

A inoculação do patógeno foi realizada com 144 horas (seis dias) após a pulverização dos tratamentos. Posteriormente, foram avaliados os dois tratamentos mais promissores, selecionados nos experimentos descritos anteriormente (item 2.4 e 2.5) em casa de vegetação, além do tratamento composto por ASM ($0,08\text{g L}^{-1}$) e do tratamento constituído pela testemunha não pulverizada, em plantas inoculadas e não inoculadas. Após o processamento das

amostras, foram analisadas as atividades das enzimas peroxidase de guaiacol, quitinase, β -1,3-glucanase e polifenoloxidase.

Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, a -20°C , até o preparo do material para as análises bioquímicas.

2.7.1 Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase

Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual foi adicionado o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (10,0 mL de tampão para cada grama de amostra), homogeneizado por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 10 minutos (0 a 4°C) e utilizou-se o sobrenadante como fonte enzimática.

2.7.2 Proteínas totais

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustada para 2,5 μL do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976).

2.7.3 Peroxidase de guaiacol

A atividade de peroxidase de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 5 μL do extrato enzimático, ajustado para 195 μL de solução contendo 274 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 363 μL de guaiacol 20 mM e 363 μL peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 480 nm (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{480\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.7.4 Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático, ajustado para 150 μL de solução contendo 473 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,2, e 527 μL de catecol 50mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 410 nm. Uma unidade PPO foi expressa como variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{410\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.7.5 Quitinase

A atividade de quitinase (CHI) foi determinada pela adição de 90 μL do extrato enzimático ajustado para 80 μL de uma solução com acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 80 μL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL⁻¹; um substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350 μL por cavidade. Após incubação a 35°C, por 90 minutos, as amostras foram acidificadas com 50 μL de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas (1.450 g por 10 minutos), a

4°C. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 550 nm, em um leitor EIA-compatível (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade da CHI foi expressa pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{550\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

2.7.6 β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase (GLU) foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4mg mL⁻¹; Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação, a 35°C, de 90 minutos. As amostras foram submetidas à leitura fotométrica em filtro de 620 nm de um leitor EIA (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade da GLU foi expressa pela variação de 1,0 OD₆₀₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{600\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados dos experimentos foram realizadas por meio do software estatístico Sisvar[®]. Para os experimentos realizados sob condições de casa de vegetação, após a obtenção dos dados sobre a severidade do oídio da soja (coletado nas avaliações dos experimentos), foi calculada, para cada tratamento, a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), por meio da fórmula proposta por Shaner e Finney (1977). Posteriormente, os valores de áreas obtidas de cada tratamento foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com o objetivo de

identificar quais tratamentos foram mais efetivos no controle da severidade do oídio da soja.

Para o experimento de caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não, foram calculados o desvio padrão e o erro padrão para cada tratamento e, posteriormente, realizaram-se a comparação e a interpretação dos resultados em relação à testemunha e ao padrão de indução de resistência ASM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos apresentaram áreas abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPSD) menores estatisticamente que a testemunha, (Gráfico 1). Esse resultado confirma a eficiência no controle da severidade do oídio da soja tanto pelo uso destes óleos essenciais (OE) como pela solução de leite (LE). Assim, estes resultados corroboram os obtidos nos experimentos anteriores.

Destacaram-se os tratamentos compostos por combinações entre CL e LE, tanto na concentração usual como na metade da concentração CL, LE e (CL LE)1/2, que se igualaram ao tratamento composto por leite a 10% (LE) e Tebuconazole (FU) (Gráfico 1). Tal fato pode viabilizar o uso dessa combinação no controle da doença. De forma análoga, Santos (2009) obteve bons resultados no controle do oídio da abobrinha utilizando a mistura de leite a 10% com diferentes concentrações de organismos antagonistas.

Os tratamentos compostos pelas combinações Ci LE e Ci CL, e óleo essencial CL, também apresentaram bons resultados, apesar de exercerem controle inferior aos tratamentos citados anteriormente, superando os tratamentos compostos por Ci CL (1/2), Ci, LE (1/2), Ci LE (1/2), Ci (1/2) e CL (1/2) que, por sua vez, apresentaram menor intensidade de doença que a testemunha.

Em relação à percentagem de redução da severidade da doença, nota-se que os tratamentos LE, CL LE(1/2) e CL LE apresentaram 59,3%, 62,2% e 62,9%, respectivamente, enquanto no tratamento no qual se utilizou o fungicida Tebuconazole essa redução foi de 67,8% (Gráfico 2). Resultados superiores foram obtidos por Santos (2009), trabalhando com a mistura de leite com o produto comercial Serenade[®] a 2%, obtendo 88,7% de controle. Controle semelhante foi verificado no experimento do item 2.5 deste trabalho (Capítulo 2,

item 2.5), com os óleos essenciais de citronela e capim-limão a 0,1% e leite a 10%, proporcionando redução de severidade no oídio da soja de 74,2%, 68,7% e 72,1%, respectivamente.

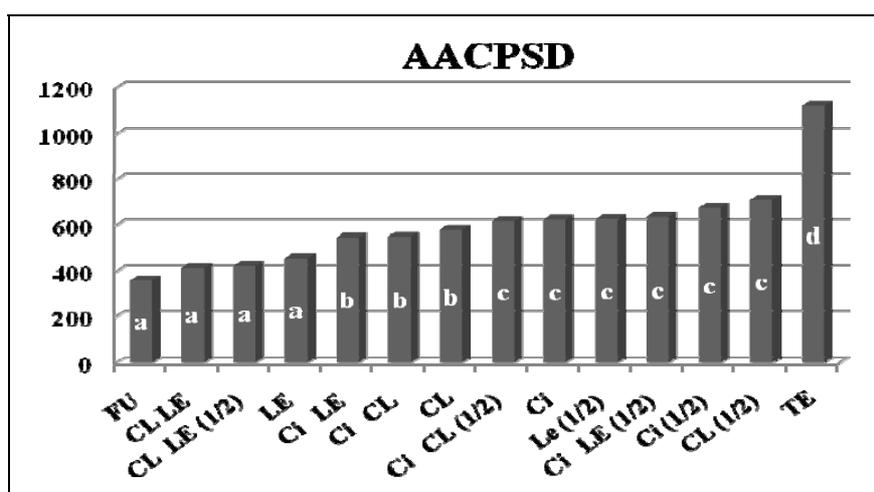


Gráfico 1 Área abaixo da curva de progresso de severidade de oídio em plantas de soja cultivar Conquista tratadas pelo método curativo com produtos alternativos. FU fungicida Tebuconazole; CL LE combinação óleo essencial (OE) de capim-limão e leite; CL LE (1/2) combinação de OE de capim limão e leite com redução de 50% na concentração; LE leite; Ci LE combinação de OE de citronela e leite; Ci CL combinação de OE de citronela e capim-limão; CL OE de capim-limão; Ci CL (1/2) combinação de OE de citronela e capim-limão com redução de 50% na concentração; Ci OE de citronela; Le (1/2) leite com redução de 50% na concentração; Ci LE (1/2) combinação de OE de citronela e leite com 50% de redução na concentração; Ci (1/2) OE de citronela com 50% de redução na concentração; CL (1/2) OE de capim-limão com 50% de redução na concentração e TE testemunha. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Bizi et al. (2008) também obtiveram resultados satisfatórios, porém, inferiores aos observado neste trabalho, ao avaliar o potencial de vários produtos alternativos para o controle do oídio em mudas de eucalipto, obtendo o valor máximo de redução da doença da ordem de 44% em mudas tratadas com LE. Por outro lado, Carvalho et al. (2008) registraram, num experimento *in vitro*, que o extrato bruto de capim-limão afetou o crescimento micelial e a esporulação de

Colletotrichum gloeosporioides em todas as concentrações estudadas, evidenciando também a atividade fungitóxica dessa espécie vegetal.

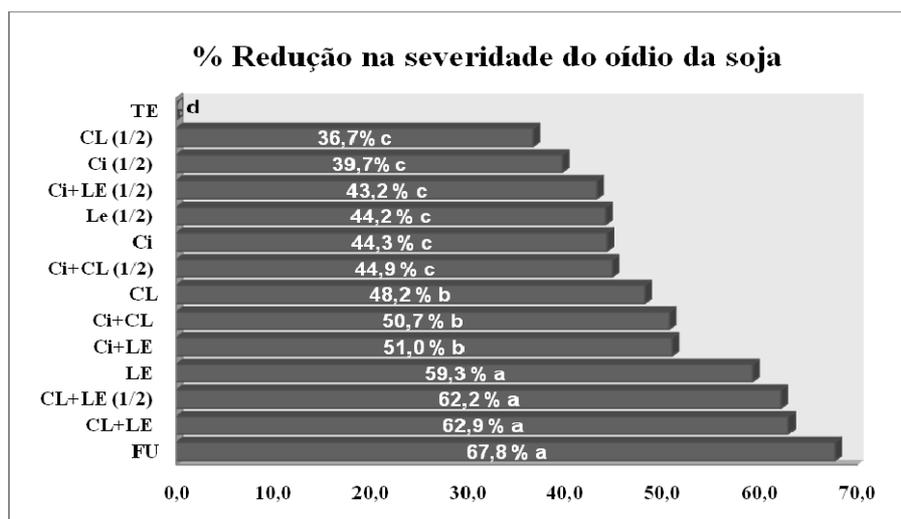


Gráfico 2 Percentagem de redução na severidade de oídio em plantas de soja cultivar conquista tratadas pelo método curativo com produtos alternativos. FU fungicida Tebuconazole, CL LE Combinação óleo essencial (OE) de capim limão e leite, CL LE (1/2) combinação de OE de capim limão e leite com redução de 50% na concentração, LE leite, Ci LE combinação de OE de citronela e leite, Ci CL combinação de OE de citronela e capim limão, CL OE de capim limão, Ci CL (1/2) combinação de óleo essencial de citronela e capim limão com redução de 50% na concentração, Ci OE de citronela, Le (1/2) leite com redução de 50% na concentração, Ci LE (1/2) combinação de OE de citronela e leite com 50% de redução na concentração, Ci (1/2) OE de citronela com 50% de redução na concentração, CL (1/2) OE de capim limão com 50% de redução na concentração, e TE - testemunha. Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Dessa forma, com a combinação entre os produtos efetivos, foi possível obter controle da doença, mesmo com redução de 50% na dosagem, tanto do OE de CL como do LE, observando que houve um sinergismo entre os produtos e levantando a hipótese de uma possível ação indireta por indução de resistência desse produto aplicado em mistura. Constata-se, assim, a propriedade proposta

por Steiner e Schonbech (1995) de que, em produtos que têm ação por indução de resistência, há ausência da correlação entre quantidade crescente do produto e resistência à doença. Ainda no que diz respeito à redução no progresso da severidade do oídio da soja, observa-se que o tratamento composto pela combinação entre OE de CL e LE promoveu uma diminuição do progresso da severidade da doença de 14,7% em relação ao OE de CL e de apenas 3,6% em relação ao tratamento composto por LE. Este fato demonstra um efeito aditivo na redução do progresso da doença promovido pelo LE adicionado ao OE de CL, demonstrando um efeito curativo pronunciado por parte do LE em relação ao tratamento composto por OE de CL que, por sua vez, poderia apresentar possível atividade mais efetiva quando aplicado de forma preventiva. Desse modo, selecionaram-se apenas os tratamentos compostos por OE de CL e a solução de LE para avaliação em experimentos posteriores

Em relação aos sintomas e sinais típicos da doença nas folhas das plantas, foi observado, nos tratamentos compostos pela combinação do OE de CL e LE, em ambas as concentrações testadas (CL LE e CL LE)^{1/2}, que houve a presença constante de um halo arroxeadado circundando a região periférica do emaranhado micelial constituinte dos sinais do patógeno na superfície foliar, podendo essa estrutura estar relacionada a possíveis acúmulo de antocianina, substância fenólica antioxidante derivada do ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), que pode estar envolvida na indução de respostas de defesa das plantas. Nesse contexto, Smith e Métraux (1991) observaram que a IR de plantas de arroz tratadas com *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* contra *Pyricularia oryzae* estava associada à deposição de um material marrom-escuro ao redor do sítio de infecção.

3.1 Efeito preventivo de produtos efetivos e combinações na severidade do oídio da soja

Conforme esperado, devido aos experimentos e seleções de produtos realizadas anteriormente, todos os produtos compostos por óleos essenciais e leite testados neste experimento apresentaram controle efetivo na severidade do oídio da soja com a aplicação dos produtos sete dias antes da inoculação (Gráfico 3). Foi possível evidenciar, novamente, que apenas a combinação composta por OE de capim-limão (CL) e LE mostrou redução na percentagem da severidade da doença compatível com o indutor de resistência ASM e com o fungicida padrão Tebuconazole (Gráfico 4).

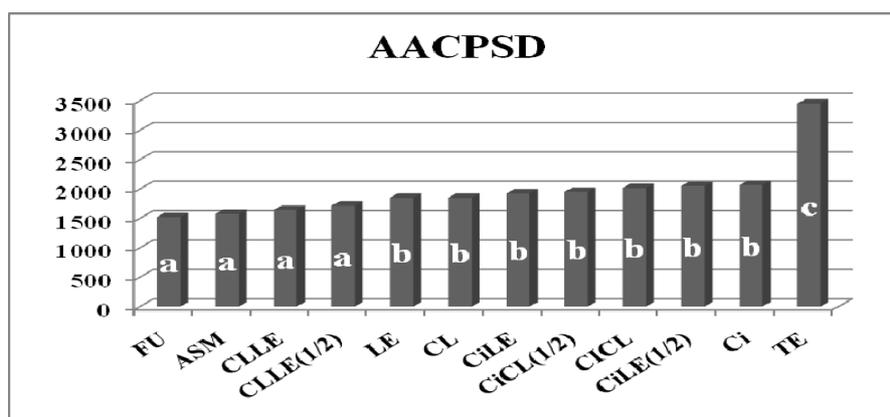


Gráfico 3 Área abaixo da curva de progresso de severidade de oídio em plantas de soja cultivar Conquista tratadas pelo método preventivo. FU fungicida Tebuconazole; ASM acibenzolar-S-metil; CL LE combinação óleo essencial de capim-limão e leite; CL LE (1/2) combinação de óleo essencial e leite com redução de 50% na concentração; LE leite; CL óleo essencial de capim-limão; Ci LE combinação de óleo essencial de citronela e leite; Ci CL combinação de óleo essencial de citronela e capim-limão; Ci CL (1/2) combinação de óleo essencial de citronela e capim-limão com redução de 50% na concentração; Ci LE (1/2) combinação de óleo essencial de citronela e leite com 50% de redução na concentração; Ci - óleo essencial de citronela e TE testemunha. Áreas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

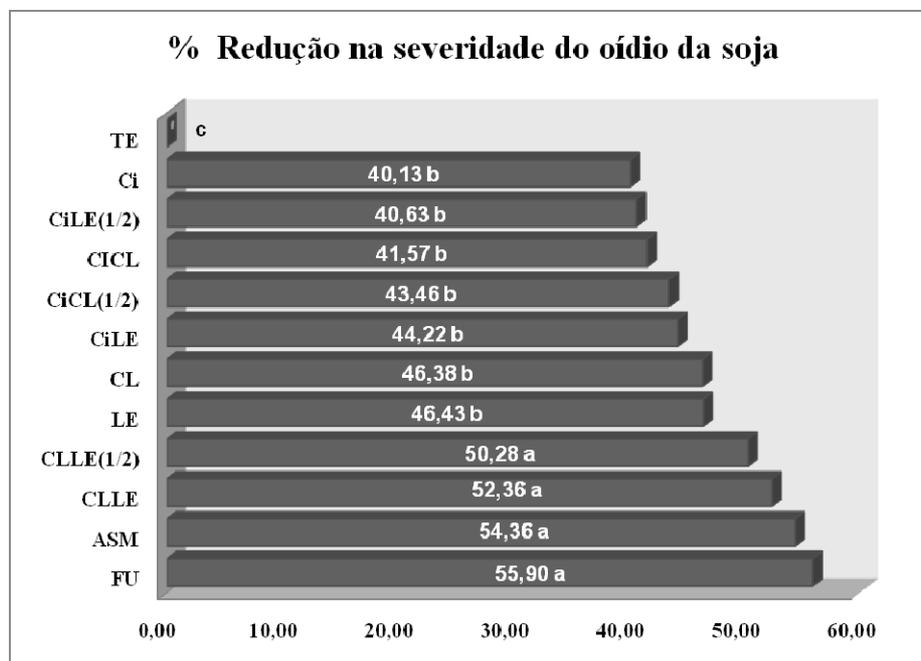


Gráfico 4 Percentagem de redução na severidade de oídio em plantas de soja cultivar Conquista tratadas pelo método preventivo. FU fungicida Tebuconazole; ASM acibenzolar-S-metil; CL LE combinação óleo essencial de capim-limão e leite; CL LE (1/2) combinação de óleo essencial e leite com redução de 50% na concentração; LE leite; Ci LE combinação de óleo essencial de citronela e leite; Ci CL combinação de óleo essencial de citronela e capim-limão; CL óleo essencial de capim-limão; Ci CL (1/2) combinação de óleo essencial de citronela e capim-limão com redução de 50% na concentração; Ci óleo essencial de citronela; Ci LE (1/2) combinação de óleo essencial de citronela e leite com 50% de redução na concentração e TE testemunha. Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Apesar da maior severidade das plantas observada de forma geral, a percentagem de redução na severidade do oídio da soja foi tão satisfatória como no experimento anterior, por parte da mistura de OE de CL e LE, atingindo valores da ordem de 52,36% de redução na severidade com o tratamento no qual se aplicou a concentração de 0,1% (1 mL L^{-1}) para o OE de CL adicionado de LE a 10% (10 mL L^{-1}), e de 50,28% em que se aplicou a concentração de 0,05%

(0,5 mL l⁻¹) para o OE de CL adicionado de LE a 5% (5 mL L⁻¹). Dessa forma, resultados superiores provavelmente seriam conseguidos com o aumento do número de pulverizações de caráter preventivo. A maior severidade das plantas, de maneira geral, em relação ao experimento anterior (item 3.1), pode ser atribuída à realização de apenas uma aplicação dos produtos em contraste com as duas aplicações realizadas no experimento anterior.

Pode-se observar também, de acordo com o gráfico 5, que, mesmo em dosagens inferiores, ou seja, com redução de 50% em ambos os ingredientes ativos (CLLE(1/2)), obteve-se redução na severidade superior ao tratamento de cada produto de forma isolada. Esta observação é concordante com o experimento anterior, em que se aplicaram os produtos de forma curativa.

Entretanto, no experimento anterior houve um efeito aditivo maior por parte do LE para o OE de CL. Já no presente experimento, comparando-se o tratamento mais efetivo, composto pela combinação entre OE de CL e LE (CLLE), com cada produto composto por OE de CL e LE isoladamente, nota-se o mesmo valor de redução no progresso da doença (5,9%) em relação a ambos os produtos aplicados de maneira preventiva. Esse dado confirma a maior atividade preventiva do que curativa por parte do OE de CL, uma vez que, comparado ao experimento anterior com a aplicação dos mesmos tratamentos de forma curativa, foi registrado um acréscimo de 14,7% no controle da doença pela combinação de produtos (CLLE) em relação ao tratamento composto por OE de CL, e de apenas 3,6% em relação ao tratamento composto por LE, reforçando um maior efeito curativo por parte do LE, embora os 5,9% de acréscimo no controle da doença pela aplicação preventiva obtida neste experimento revelem também uma atividade preventiva razoável.

Stadnik e Bettiol (2001) ressaltam a importância do LE em aumentar a colonização da superfície foliar por microrganismos antagonísticos. Esse fator também favorece a atividade de natureza preventiva observada pela mistura

entre OE de CL e LE, avaliadas neste estudo. Já Crisp et al. (2006) sugerem a hipótese de que o controle de oídios por LE é proporcionado pela ação de radicais livres e de agentes antimicrobianos presentes no leite, como a lactoferrina e a lactoperoxidase, encontradas em maior quantidade no colostro do leite bovino, além de outros possíveis mecanismos contribuintes. Assim, os dados deste experimento, em conjunto com os dados do experimento anterior (item 3.1), oferecem suporte para o esclarecimento e o estudo mais detalhado sobre o modo de ação do LE quando combinado com o OE de CL, auxiliando na obtenção de resultados conclusivos.

À semelhança do experimento anterior, com relação aos sintomas e sinais típicos da doença nas folhas das plantas, também foi observada, nos tratamentos compostos pela combinação do OE de CL e LE, em ambas as concentrações testadas, a presença constante de um halo arroxeadado circundando a região periférica do emaranhado micelial constituinte dos sinais do patógeno na superfície foliar, sugerindo uma possível ação por indução de respostas de defesa das plantas ao patógeno por parte desse produto obtido pela combinação entre produtos alternativos.

3.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folíolos de soja submetidos ao tratamento curativo e preventivo pela combinação de OE de CL e LE

Na análise morfológica realizada por MEV, foi constatado extravasamento do conteúdo de hifas e conídios em todos os tratamentos compostos pela combinação de OE de CL e LE, mesmo quando da aplicação preventiva desse produto (Figura 1). Porém, o extravasamento do conteúdo de hifas e conídios foi mais evidente nos folíolos tratados pelo método curativo. Tal

fato confirma novamente a atividade direta por parte desses produtos também observada em experimentos anteriores.

No entanto, em relação ao tratamento aplicado previamente, composto pela combinação entre o OE de CL e LE, chamado de CLLE, em ambas as concentrações testadas, assim como o tratamento composto por ASM, notou-se uma diferença no comportamento do micélio fúngico, evidenciada pelo excesso de formação de apressórios de *E. diffusa* sobre a epiderme do folíolo da soja. Tal comportamento pode representar uma estratégia por parte do referido fungo, desencadeada a fim de vencer possíveis mecanismos de resistência à penetração, impostos pela planta quando previamente tratada (Figura 1 A, B e C).

Em relação aos tratamentos nos quais se aplicou a combinação (CL LE)/2 e o fungicida Tebuconazole pelo método curativo, além do pronunciado extravasamento e rompimento de hifas e conídios, também foi observado sensível aumento da quantidade de apressórios evidentes (Figura 1 D e E). Porém, quando dessa ocorrência, estes se apresentavam também com extravasamento. Tal fato não foi observado somente nos tratamentos compostos pela testemunha tratada com água, quando aplicada de modo curativo e preventivo, não havendo diferença evidente entre conídios e hifas, os quais se apresentaram predominantemente túrgidos e intactos (Figura 1 F).

De forma análoga, Crisp et al. (2006), usando a MEV para estudar a atividade de leite e soro de leite no controle do oídio da videira, incitado por *Uncinula necator*, relataram que os tratamentos compostos por leite apresentaram colapso de hifas e também a perda da integridade de conídios após 24 horas de tratamento. Este resultado também foi observado quando da aplicação de peróxido de hidrogênio como fonte de radicais livres, em folhas de videira infectadas pelo patógeno. Estes autores sugerem que o controle de oídios pelo leite deve-se à produção de radicais livres, porém, não descartam a hipótese de existência de outros mecanismos de ação.

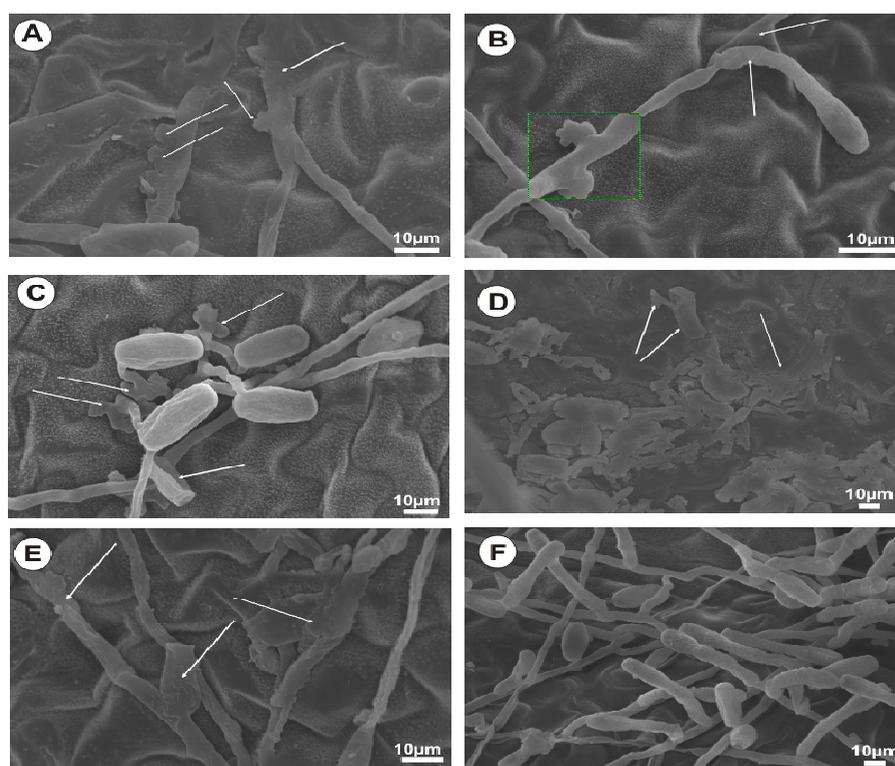


Figura 1 Eletromicrografia de varredura de folíolos de soja cv. Conquista submetidos à aplicação preventiva e/ou curativa. A e B: epiderme foliar de soja tratada previamente pela combinação de óleo essencial (OE) de capim-limão (CL) e leite (LE), na dose de $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ de OE de CL e 5 mL L^{-1} de LE (CLLE)1/2; C: epiderme foliar de soja tratada previamente com o padrão de indução de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), na dose de $0,08 \text{ g L}^{-1}$; D: epiderme foliar de soja tratada pelo método curativo com a combinação de OE de CL e LE (CLLE)1/2; E: epiderme foliar de soja tratada pelo padrão de inibição fungicida Tebuconazole, na dose de $1,67 \text{ mL L}^{-1}$ e F: epiderme foliar de soja submetida à pulverização de água destilada

3.3 Caracterização dos mecanismos bioquímicos (peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β -1,3-glucanase) envolvidos na resposta de defesa induzida em plantas de soja tratadas ou não com os produtos alternativos efetivos contra *E. diffusa*

Para a atividade da enzima peroxidase de guaiacol (POX) em plantas não inoculadas (Gráfico 5A), o tratamento (CL LE)/2 composto pela combinação do OE de CL e LE induziu a atividade da POX, apresentando atividade superior ao tratamento padrão de indução de resistência composto pelo acibenzolar-S-metil, uma vez que, para este, ocorreu apenas um pico de atividade da referida enzima, o qual se deu aos dois dias após a pulverização (DAP). Já para o tratamento constituído por (CL LE)/2 houve a indução de dois períodos de atividade da enzima POX, sendo o primeiro obtido com um dia após a pulverização (DAP) e o segundo aos seis DAP.

Já para a atividade da POX em plantas tratadas e inoculadas por *E. diffusa*, foi observado que ambos os produtos alternativos avaliados apresentaram incremento da atividade da POX (Gráfico 5B), superando o padrão de indução de resistência ASM. Entretanto, diferente do resultado observado em plantas não inoculadas, o tratamento composto por CL LE apresentou dois picos de atividade da POX, os quais ocorreram aos oito e dez DAP, enquanto o tratamento composto pelo próprio produto alternativo com redução de 50% na dose (CL LE)/2 apresentou apenas um pico de atividade enzimática da POX (aos dez DAP). Mesmo assim, nota-se que este superou os produtos compostos pelo padrão de indução de resistência ASM e pelo próprio produto alternativo CL LE, por apresentar um pico efetivamente superior nessa ocasião.

Esses resultados mostram-se superiores aos obtidos por Peiter-Beninca et al. (2008) que, estudando a atividade de peroxidases em planta de soja tratada com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, observaram que a

atividade específica da POX foi induzida pelo extrato hexânico de *P. sanguineus*. No entanto, não diferiu do tratamento composto pelo ASM. Os resultados obtidos diferem em relação aos obtidos por Sbalcheiro (2010), nos quais plantas de soja cultivar BRS 243 RR tratadas somente com ASM apresentaram atividade de POX superior aos demais tratamentos compostos por agentes de controle biológico e, mesmo quando as plantas foram desafiadas com o patógeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, a atividade permaneceu superior à da testemunha. O mesmo autor ressalta que esses resultados demonstram que ASM promove o aumento das respostas de defesa, mesmo em cultivares resistentes ao patógeno.

Dessa forma, a efetividade dos produtos alternativos compostos por OE e LE na indução da atividade da POX evidencia a ativação de genes envolvidos em diversas respostas de defesa, tais como explosões oxidativas (LAMB; DIXON, 1997) e respostas de hipersensibilidade (ZIMMERLI et al., 2000) que, junto com outras reações disparadas pelo evento de indução, irão culminar na resposta de defesa das plantas contra a invasão do patógeno. Nesse contexto, Kuhn (2007) ressalta que, na maioria dos casos, o aumento na atividade das peroxidases está diretamente relacionado à redução da severidade da doença. Assim, o aumento da atividade de peroxidases poderia explicar a menor severidade do oídio da soja observada em plantas tratadas pelo produto alternativo (CL LE)/2 em experimentos anteriores.

Para a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) em plantas não inoculadas por *E. diffusa*, ambos os produtos alternativos avaliados apresentaram períodos de incremento da atividade enzimática semelhantes, tendo sido observados quatro picos da enzima, os quais ocorreram aos um, seis, oito e dez dias após a pulverização dos produtos (Gráfico 6). Neste caso, observou-se que o produto alternativo composto pela combinação de OE e LE com redução de 50% da dose (CL LE)/2 apresentou atividade da PPO aos um e

seis DAP. Os quais superaram o próprio produto alternativo, quando aplicado na maior dosagem dos ingredientes que o compõem. Além disso, foi observado também, para plantas tratadas e não inoculadas pelo patógeno, que o tratamento composto pelo padrão de indução de resistência ASM apresentou cinco picos de indução da atividade da enzima PPO (Gráfico 6).

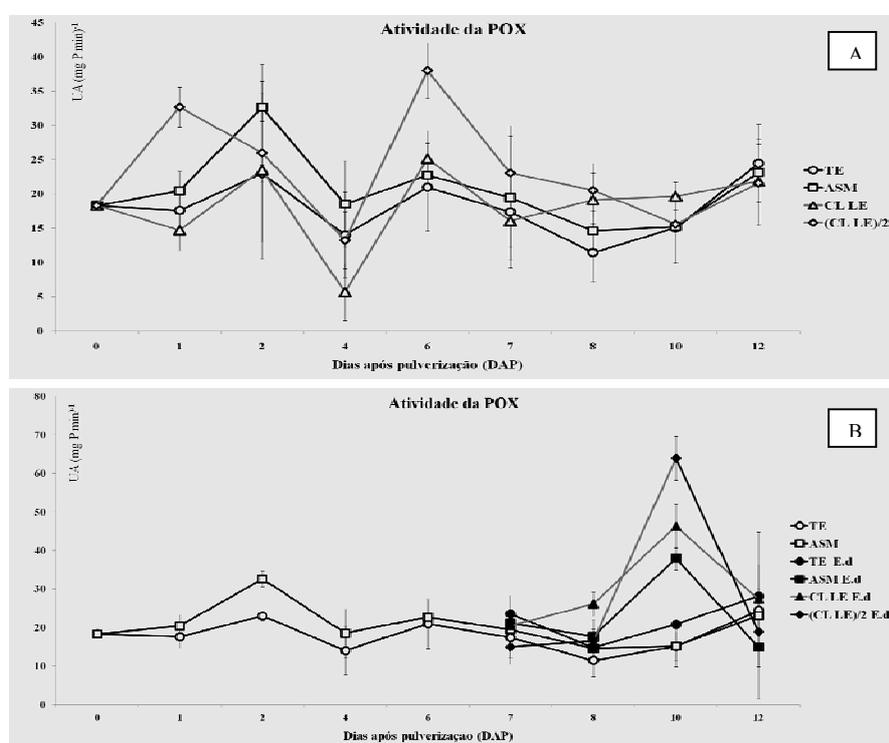


Gráfico 5 Atividade da enzima peroxidase – POX em diferentes dias após a pulverização. Plantas tratadas e não inoculadas (A) e plantas tratadas e inoculadas (B). UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$; CL LE: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a $0,5$ e 5 mL L^{-1} , respectivamente; TE E.d: testemunha inoculada com *E. diffusa* aos 6 DAP, sem aplicação de produtos; ASM E.d: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$, inoculada aos 6 DAP; CL LE E.d: combinação de óleo essencial(OE) de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP; (CL LE)/2 E.d: combinação de OE de capim-limão e leite a $0,5$ e 5 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP

Superando os demais tratamentos. Entretanto, aos oito DAP, o tratamento composto pelo produto alternativo (CL LE)/2 apresentou atividade enzimática significativamente superior à deste reconhecido indutor.

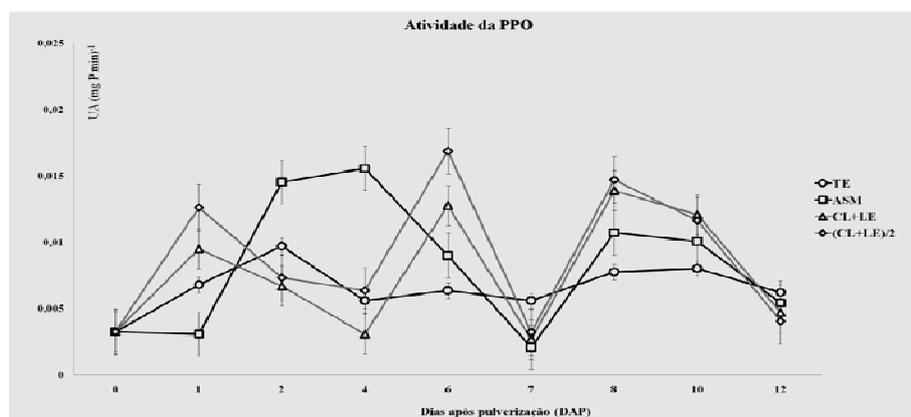


Gráfico 6 Atividade da enzima polifenoloxidase - PPO - em diferentes dias após a pulverização, para plantas tratadas e não inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{ g L}^{-1}$; CL LE: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente

Em relação a plantas tratadas e inoculadas (Gráfico 7 e 8), ainda para atividade enzimática da PPO, foi observado que o tratamento composto pelo produto alternativo CL LE demonstrou efetiva atividade indutora da enzima com três picos de atividade da enzima PPO, superando o tratamento composto pelo padrão de indução de resistência ASM (Gráfico 8). Porém, nesse caso, ao contrário do resultado obtido para a atividade dessa enzima em plantas tratadas e não inoculadas, o tratamento composto pelo produto alternativo CL LE na maior dose superou o próprio produto, quando aplicado com redução de 50% em ambos os ingredientes da fórmula. Desse modo, observou-se que o tratamento CL LE apresentou picos de atividade da PPO aos sete, oito e dez DAP, ao passo

que o tratamento (CL LE)/2 apresentou apenas um pico de indução da atividade da PPO aos dez DAP. Entretanto, este não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento CL LE.

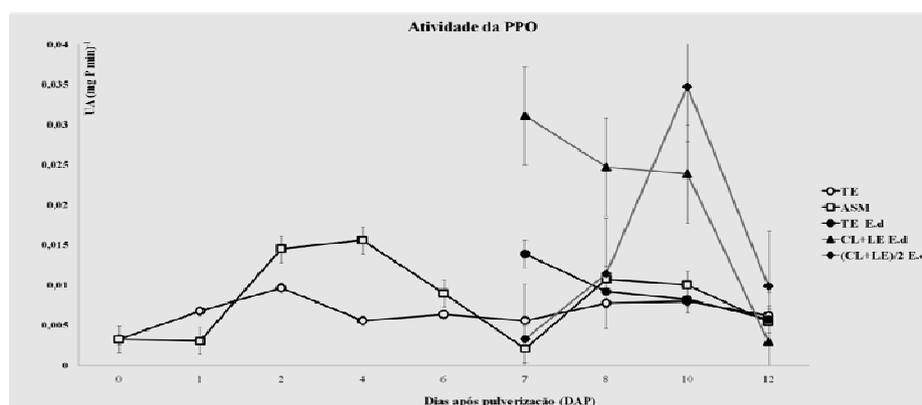


Gráfico 7 Atividade da enzima polifenoloxidase - PPO em diferentes dias após a pulverização para plantas tratadas e inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos não inoculada; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08 \text{ g L}^{-1}$ não inoculada; TE E.d: testemunha inoculada com *E. diffusa* aos 6 DAP, sem aplicação de produtos; CL LE E.d: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP; (CL LE)/2 E.d: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP

Foi observado, ainda, que, para o tratamento composto pelo indutor de resistência padrão ASM, em plantas inoculadas (Gráfico 8), houve apenas dois picos de indução da enzima PPO, os quais ocorreram aos sete e aos dez DAP e, por sua vez, não se diferenciou do tratamento composto por CL LE aos sete e aos dez DAP e ainda não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento composto pelo (CL LE)/2, apesar de superar este tratamento em número de picos enzimáticos.

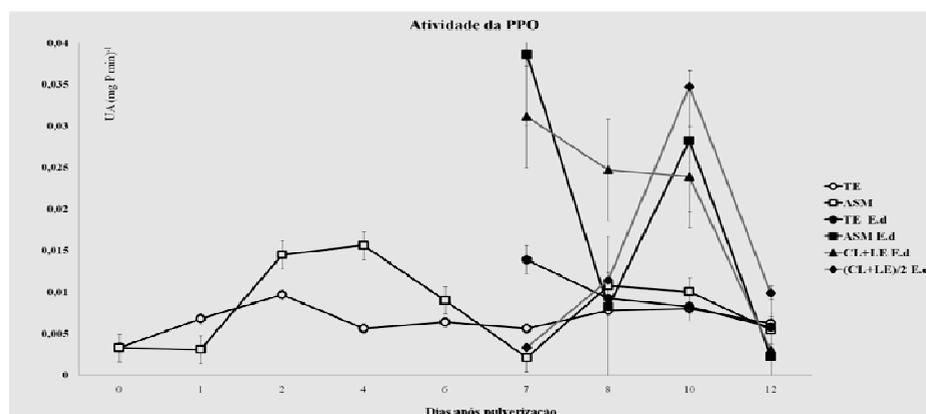


Gráfico 8 Atividade da enzima polifenoloxidase- PPO em diferentes dias após pulverização para plantas tratadas e inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por min; TE: testemunha sem aplicação de produtos não inoculada; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ não inoculada; TE E.d: testemunha inoculada com *E. diffusa* aos 6 DAP, sem aplicação de produtos; ASM E.d: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ inoculada aos 6 DAP; CL LE E.d: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP

Estes resultados de incremento na atividade da enzima PPO superaram os obtidos por Kuhn (2007) que, ao avaliar a indução da atividade da enzima PPO propiciada pelo indutor ASM e pelo agente de controle biológico *Bacillus cereus*, não observou alterações significativas na atividade de PPO em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas com o agente de controle biológico em relação ao ASM. Além disso, observa-se que houve forte ativação da enzima PPO logo após a inoculação das plantas (7 DAP) para os tratamentos compostos por CL LE e pelo padrão ASM. Esse resultado corrobora a afirmação de Vitti (2009) de que o ASM, quando aplicado previamente, ativa os mecanismos de defesa naturais da planta, mantendo-a em alerta. Sendo assim, sob condições adversas, a planta reage rapidamente, por meio da produção de compostos de defesa, com velocidade e em quantidades suficientes para tornar a resposta da

planta eficiente na redução dos danos ocasionados por tal evento (SBALCHEIRO, 2010).

O incremento observado na atividade da enzima PPO sugere que a aplicação desse produto alternativo também é capaz de induzir respostas de defesa que envolvem a ativação da rota dos fenilpropanoides pois, segundo Thaler et al. (2001), a enzima polifenoloxidase (PPO) é um importante metabólito secundário oriundo da referida rota. Em relação à indução da atividade das enzimas POX e PPO, Vigo et al. (2009) não obtiveram incremento na atividade das enzimas em plantas de feijoeiro-comum (*P. vulgaris*) submetidas ao tratamento com os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Cinnamomum zeylanicum*, visando o controle da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do cretamento bacteriano comum do feijoeiro.

Para os dados da atividade da enzima quitinase (CHI) em plantas não inoculadas (Gráfico 9), nota-se que foi obtido resultado semelhante aos observados para a atividade das enzimas POX e PPO em plantas não inoculadas, uma vez que o tratamento composto pelo produto alternativo aplicado na menor dose, denominado (CL LE)/2, superou o tratamento composto pelo mesmo produto em maior dosagem e pelo indutor de resistência padrão ASM. Neste caso, o referido tratamento apresentou três períodos de incremento na atividade da enzima CHI, contra um e dois picos obtidos, respectivamente, pelos tratamentos compostos pelo indutor de resistência padrão (ASM) e pela combinação de OE de CL e LE aplicada na maior dose (CL LE), revelando um forte efeito indutor e confirmando a ação de indução de resistência por parte deste produto observada também para a atividade da POX e PPO e hipotetizada nos experimentos do item 3.1 e 3.2, em que foram obtidas reduções semelhantes na severidade da doença em plantas tratadas por esse produto na maior e menor dose.

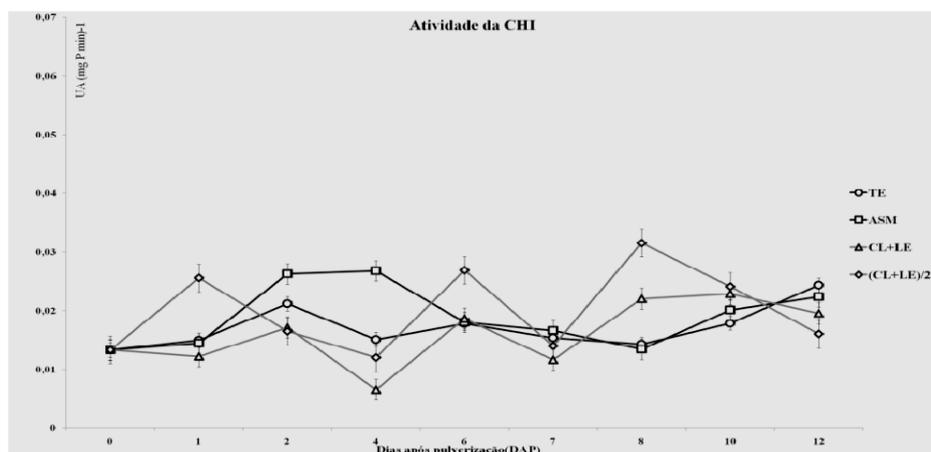


Gráfico 9 Atividade da enzima quitinase – CHI em diferentes dias após a pulverização para plantas tratadas e não inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{ g L}^{-1}$; CL LE: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente

Esta maior atividade da enzima CHI no tratamento composto por (CL LE)/2 foi novamente observada para plantas tratadas pelos referidos produtos e, posteriormente, inoculadas, obtendo-se três picos de indução da enzima CHI em plantas tratadas pelo produto alternativo (CL LE)/2 e apenas dois picos para os tratamentos compostos pelo padrão de indução de resistência e pelo produto alternativo CL LE (Gráfico 10), embora estes tenham superado o tratamento (CL LE)/2.

Segundo Baysal, Soylu e Soylu (2003), a indução da atividade da enzima quitinase (CHI) está intimamente envolvida no acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Ps), fato que confirma a efetividade desses produtos na indução de resistência das plantas.

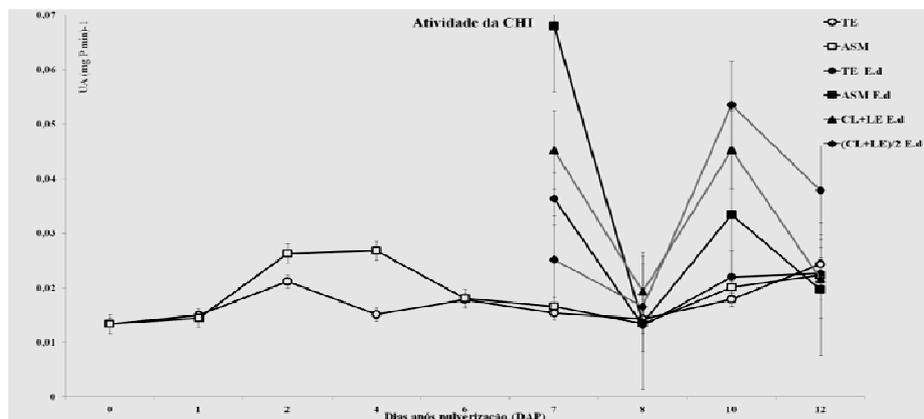


Gráfico 10 Atividade da quitinase - CHI, em diferentes dias após a pulverização para plantas tratadas e inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos não inoculada; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ não inoculada; TE E.d: testemunha inoculada com *E. diffusa* aos 6 DAP, sem aplicação de produtos; ASM E.d: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ inoculada aos 6 DAP; CL LE E.d: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP

Para a atividade da enzima β -1,3-glucanase (GLU) (Gráfico 11), obteve-se maior atividade da referida enzima em plantas tratadas pelo produto alternativo (CL LE)/2 junto do padrão ASM, em que ambos apresentaram dois picos de atividade da enzima contra apenas um pico para plantas tratadas com o produto alternativo CL LE. Esse resultado concorda com o obtido anteriormente para as enzimas POX e CHI em plantas tratadas e não inoculadas por *E. diffusa*, em que se observou a maior efetividade do tratamento (CL LE)/2 em relação ao tratamento CL LE, confirmando a efetividade desse produto na indução de resistência.

Já para plantas tratadas e inoculadas por *E. diffusa* foram, novamente, observados dois picos de indução de atividade por parte dos produtos alternativos compostos pela combinação de óleos essenciais e leite, com redução de 50% na dosagem (Gráfico 12), os quais ocorreram aos dez e 12 DAP. Sendo

assim, assemelham-se ao tratamento composto pelo indutor de resistência padrão ASM que, nessa ocasião, apresentou atividade maior da GLU com dois picos, os quais aconteceram aos sete e dez dias após a pulverização (DAP).

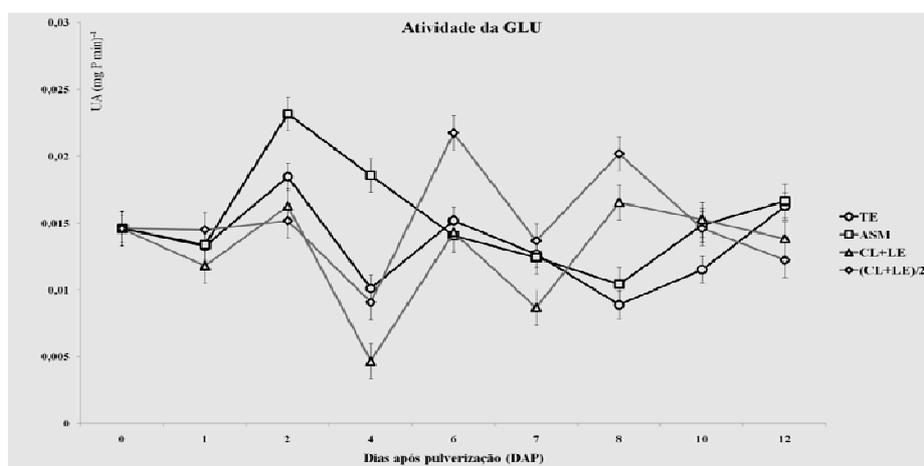


Gráfico 11 Atividade da enzima β -1,3-glucanase – GLU, em diferentes dias após a pulverização para plantas tratadas e não inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$; CL LE: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente

Foi observado, ainda, que, em plantas não tratadas e inoculadas (Gráfico 12), houve um aumento inicial da atividade da GLU logo após a inoculação do patógeno. Este comportamento, segundo Pereira et al. (2008), é um indicativo de que a inoculação, por si só, pode promover aumento na atividade da enzima.

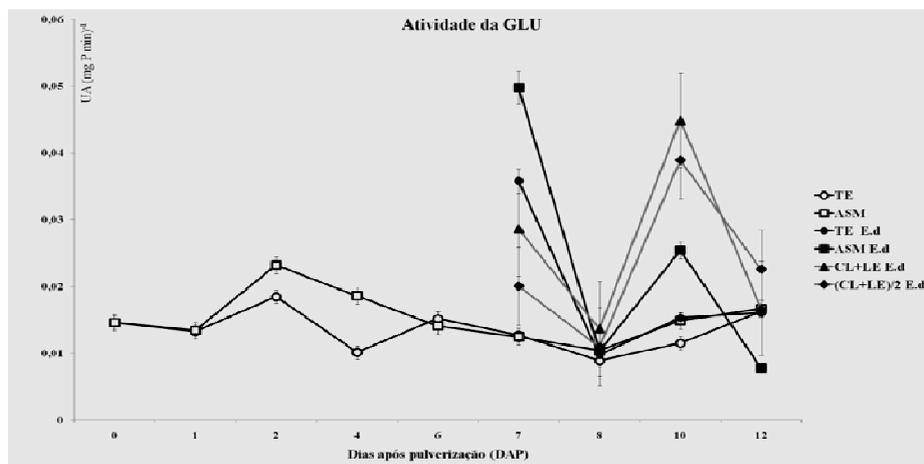


Gráfico 12 Atividade da enzima β -1,3-glucanase – GLU em diferentes dias após a pulverização para plantas tratadas e inoculadas. UA: unidade de atividade por mg de proteína por minuto; TE: testemunha sem aplicação de produtos ; ASM: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ não inoculada; TE E.d: testemunha inoculada com *E. diffusa* aos 6 DAP, sem aplicação de produtos; ASM E.d: acibenzolar-S-metil a $0,08\text{g L}^{-1}$ inoculada aos 6 DAP; CL LE E.d: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 1 e 10 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP; (CL LE)/2: combinação de óleo essencial de capim-limão e leite a 0,5 e 5 mL L^{-1} , respectivamente, inoculada aos 6 DAP

4 CONCLUSÕES

A combinação entre o óleo essencial (OE) de capim-limão e leite (LE) nas doses de $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ e 5 mL L^{-1} , respectivamente, denominada (CL LE)/2, quando aplicada de modo curativo, promove ação direta sobre estruturas de *E. diffusa* e reduz a severidade do oídio em plantas de soja, ao passo que, aplicado de modo preventivo, induz a ativação de enzimas envolvidas na resposta de defesa da planta e reduz a severidade do oídio da soja.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Brasil supera EUA no consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ande.com.br/informativo/ande.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.

ALMEIDA, A. M. et al. Caracterização de isolados de oídio de soja, feijão, girassol e plantas daninhas no Brasil usando sequências de rDNA-ITS. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 21-26, fev. 2008.

AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: [s. n.], 1997. 114 p.

BAYSAL, Ö; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-Smethyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*. **Plant Pathology**, London, v. 52, n. 6, p. 747-753, July 2003.

BIZI, R. M. et al. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 144-148, jan. 2008.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 248-254, May 1976.

BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. Phylogeny of Erysiphe, Microsphaera, Uncinula (Erysipheae) and Cystotheca, Podosphaera, Sphaerotheca (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, Garten, v. 4. n. 1, p. 1-33, Feb. 2000.

CARVALHO, J. B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 88-93, ago. 2008.

CRISP, P. et al. Sustainable control of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ORGANIC WINE GROWING, 1., 2004, Stugart. **Abstract guide...** Stugart: Organic Europe, 2004. p. 47-52.

DEGÁSPARI; C. H; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jun. 2004

KUHN, J. O. **Indução de resistência em feijeiro (*Phaseolus vulgaris*), aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 4, n.1 p. 251- 275, 1997.

PEITER-BENINCA et al. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 285-292, mar. 2008.

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. 1287-1296, out. 2008.

SANTOS, A. P. **Controle do oídio da abobrinha com antagonistas e produtos biocompatíveis.** 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SBALCHEIRO, C. C. **Uso de *Bacillus* sp e Acibenzolar-S-Metil como indutores de resistência ao cretamento bacteriano em soja (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)**. 2010. 195 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: USP, 2003. p. 147.

SHANER, G.; FINEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Apul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Feb. 1977.

SMITH, J. A.; MÉTRAUX, J. P. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 39, n. 6, p. 451- 461, Dec. 1991.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 95-116.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induce disease in monocots. In: HAMMERSCHMIDT R.; KUC, J. (Ed.). **Induce resistance to disease in plants**. Dordrech: Kluwer, 1995. p. 86-110.

THALER, J. S. et al. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivore. **Ecological Entomology**, London, v. 26, n. 3, p. 312-324, June 2001.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, Warszawa, v. 13, n. 1, p. 43-50, Feb. 1991.

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

VITTI, A. J. Indução de resistência pelo Bion em diversas culturas de interesse econômico. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 32., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS, 4., 2009, São Pedro. **Anais...** São Pedro: USP, 2009. p. 5.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 197-205. Dec. 1990.

YORINORI, J. T. et al. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.; SOUZA, P. I. M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 333-397.

ZADOKS, J. C. The cost of change in plant protection. **Journal of Plant Protection Research**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 2, p. 151-159, Mar. 1992.

ZIMMERLI, L. et al. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, East Lansing, v. 97, n. 7, p. 12912- 12925, Nov. 2000.