



**PRODUTOS ALTERNATIVOS NO MANEJO DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)
DA SOJA**

REGIANE MEDICE

2007

REGIANE MEDICE

**PRODUTOS ALTERNATIVOS NO MANEJO DA FERRUGEM
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*) DA SOJA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Medice, Regiane.

Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja. / Regiane Medice. -- Lavras: UFLA, 2007.

102 p. il.

Orientador: Eduardo Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ferrugem asiática. 2. Produtos Alternativos. 3. Óleos essenciais . 4.

Phakopsora pachyrhizi. 5. Soja I. Universidade Federal de Lavras. II.

Título. Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja

CDD-

REGIANE MEDICE

**PRODUTOS ALTERNATIVOS NO MANEJO DA FERRUGEM
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*) DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de julho de 2007

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

DFP-UFLA

Dra. Sara Maria Chalfon de Souza

EPAMIG/UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL
2007

A Deus e ao meu anjo da guarda, por sempre estarem comigo em meus momentos difíceis e felizes.

A minha grande amiga Reni Saath, pela amizade, carinho e apoio.

Aos meus amigos, Ronaldo Goulart Magno Júnior e Daniela Coutinho Mourão, pelo incentivo.

A uma pessoa muito especial em minha vida, Ricardo Vale, pelos momentos de paciência e carinho.

OFEREÇO

A minha mãe, Maria Leonora Medice e minha avó, Maria Stefani, pela confiança, amor e apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao meu avô Benedito Medice (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve me iluminando em todos os momentos de minha vida.

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pela orientação, dedicação, paciência e amizade. Sua confiança e perseverança foram essenciais para a realização do meu trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa para a realização do trabalho.

Ao professor Dr. Luis Antonio Augusto Gomes, pela co-orientação e ajuda quando necessitei.

Ao professor Dr. Pedro Milanez de Rezende, pela atenção e sugestão para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Wagner Bettiol, por ceder material para o desenvolvimento dos experimentos.

A minha mãe e minha avó, por se preocuparem com minha saúde e bem-estar.

Aos melhores amigos, Daniela e Ronaldo que, mesmo com a distância nos separando, sempre me apoiaram, incentivaram e me fizeram acreditar em meu potencial.

Ao meu namorado, Ricardo Vale, pelo carinho e compreensão nos momentos em que a distância nos separou.

A minha amiga Reni, que me incentivou muito a lutar nos momentos de fraqueza, por seu amor e carinho.

À Dra. Sara Maria Chalfon e ao prof. Dr. Ricardo Magela de Souza, por aceitarem o convite por participarem na banca.

Ao amigo e estagiário Fabiano José Perina, que sempre ajudou nos experimentos, por sua paciência, pelo entusiasmo, dedicação, amizade e atenção, por ter demonstrado responsabilidade todas as vezes que lhe pedi ajuda e, enfim, pelo seu bom coração.

À grande amiga Eloísa Leite, por sua amizade, apoio, carinho, por sempre ter me incentivado, pela dedicação no preparo das amostras e, enfim, por sempre ser prestativa quando necessitei.

Aos meus colegas Eudes e Jadir, pela ajuda e amizade.

Aos laboratoristas do Departamento de Fitopatologia em especial às funcionárias Rute e Ana, sempre dispostas a ajudar.

Ao professor e amigo Ednaldo Andrade, pela ajuda na parte estatística.

À minha amiga Mariney, pela amizade e paciência nos momentos de dificuldade que enfrentei.

Aos colegas de laboratório, Glauco e Suellen, pela paciência em avaliar experimentos.

Aos técnicos e servidores do Departamento de Fitopatologia em especial Bruno e Vladimir, por colaborarem na realização dos experimentos.

Aos meus colegas de turma de mestrado e departamento, que sempre estarão presentes em minhas recordações: Grazieli, Hermínio, Ricardo, Joel, Cleilson, Franklin, Liliana, Mirella, Renata, Márcia, Sara, Janine, Rosana, Alessandra, Vanessa e Dagma.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e a conquista de mais um sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii

CAPÍTULO 1: Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja.....

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Distribuição geográfica.....	5
2.2 Etiologia da ferrugem da soja.....	5
2.3 O ciclo de vida.....	7
2.4 O modo de penetração.....	7
2.5 Os sintomas.....	8
2.6 Condições ambientais favoráveis à doença.....	9
2.7 O modo de disseminação.....	10
2.8 Manejo da ferrugem da soja.....	11
2.9 Produtos alternativos no controle de doenças em plantas.....	11
2.10 Atividade biológica dos produtos naturais.....	12
2.11 Indução de resistência por meio do uso de óleos essenciais e extrato de plantas medicinais.....	15
2.12 A microscopia aplicada no estudo de fungos e sua interação com planta...16	
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

CAPÍTULO 2: Óleos essenciais e extrato de bulbos de alho (*Allium sativum* L.) na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*.....

RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28

INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Instalação do experimento.....	31
2.2 Obtenção dos produtos utilizados no experimento.....	31
2.3 Obtenção do extrato de alho.....	31
2.4 Obtenção e preparo do inóculo.....	31
2.5 Inibição da germinação dos urediniósporos.....	32
2.6 Delineamento experimental.....	33
2.7 Análise estatística.....	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1 Inibição da germinação dos esporos.....	34
3 CONCLUSÃO.....	36
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

CAPÍTULO 3: Produtos alternativos para o controle da ferrugem asiática em casa de vegetação.....

RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Instalação experimental.....	45
2.2 Obtenção das sementes e condução do experimento.....	45
2.3 Produtos utilizados.....	46
2.4 Obtenção e inoculação do patógeno.....	46
2.5 Preparo e obtenção dos produtos alternativos utilizados no ensaio.....	47
2.5.1 Obtenção e preparo dos óleos essenciais.....	47
2.5.2 Preparo da suspensão do antagonista.....	48

2.5.3 Obtenção e preparo do indutor de resistência e fungicida.....	48
2.5.4 Obtenção e preparo do extrato de bulbos de alho.....	49
2.6 Avaliações.....	49
2.7 Preparo e observação de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
3.1 Efeito das doses de óleos essenciais sobre a severidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em plantas de soja.....	51
3.2 Vigor das plantas.....	56
3.3 Observações das amostras de folhas de soja submetidas aos tratamentos com produtos alternativos por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	60
4 CONCLUSÕES.....	64
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

CAPÍTULO 4: Óleos essenciais, extrato de alho (<i>Allium sativum</i> L.) e extrato de <i>Bacillus subtilis</i> no controle da ferrugem asiática da soja em campo.....	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 Instalação do experimento e condução do ensaio.....	72
2.2 Avaliação da doença.....	73
2.3 Plotagem da curva de progresso.....	74
2.5 Análise estatística.....	74
2.6 Dados climáticos.....	74

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	75
3.1 Severidade.....	75
4 CONCLUSÕES.....	80
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPITULO 5: Alterações provocadas por óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e extrato de <i>Bacillus subtilis</i> sobre os urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>.....	83
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
1 INTRODUÇÃO.....	86
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1 Instalação do experimento e coleta de material.....	87
2.2 Tratamentos empregados.....	87
2.3 Método utilizado na montagem do ensaio.....	87
2.4 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
3.1 Efeito de óleos essenciais, extrato de alho e acibenzolar-S-methyl na germinação de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	89
3.2 Efeito da suspensão de <i>Bacillus subtilis</i> na germinação de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	93
4 CONCLUSÕES.....	95
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXOS.....	98

RESUMO

MEDICE, Regiane. – **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja** 2007. Cap 1, p.97. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG*.

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: (i) avaliar o efeito de óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) 0,1%, *Cymbopogon nardus* (L.) (citronela) 0,05%, *Azadirachta indica* (nim) 0,1%, *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) 0,06%, *Thymus vulgaris* (tomilho) e extrato de bulbos de alho 2% (*Allium sativum*) na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*; (ii) avaliar a eficiência dos óleos essenciais, extrato de bulbos de alho, suspensão de *Bacillus subtilis* e Acibenzolar-S-methyl (ASM) (indutor de resistência) como possíveis produtos alternativos para o controle da ferrugem asiática da soja em casa de vegetação; (iii) avaliar a evolução da ferrugem asiática da soja durante os tratamentos com óleos essenciais, extrato de bulbos de alho e suspensão de *B. subtilis* em situação de campo; (iv) observar através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) o efeito de óleos essenciais, extrato de bulbo de alho, suspensão de *B. subtilis* e ASM na germinação e esporulação da *P. pachyrhizi*. Os resultados demonstraram que, tanto os óleos essenciais, quanto os extratos apresentaram efeitos tóxicos no ensaio de germinação quando comparado a testemunha e ao controle positivo (fungicida). No experimento realizado em casa de vegetação, com exceção do ASM, todos os tratamentos empregados diferenciaram estatisticamente da testemunha, segundo o teste de Scott Knott a 95% de significância, ou seja, os produtos reduziram a severidade da ferrugem asiática em soja. A eficiência dos tratamentos também foi observada em imagens geradas por MEV. Tanto os óleos quanto os extratos ocasionaram murchas e inibição da germinação dos urediniósporos da *P. pachyrhizi*. No bioensaio realizado em campo, utilizando-se produtos alternativos, com exceção do tratamento com óleo essencial de tomilho, observou-se por meio da área abaixo da curva de progresso da severidade que todos os tratamentos apresentaram resultados positivos quando comparados à testemunha. Através da MEV no experimento realizado em folhas destacadas, verificou-se que os óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, melaleuca, nim, tomilho, extrato de bulbos de alho e suspensão de *B. subtilis* ocasionaram murcha dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*, comparados ao tratamento com um fungicida. Entretanto, o tratamento com ASM não interferiu na morfologia dos esporos do patógeno, comportando-se de maneira semelhante ao controle, ou seja, ocorreu germinação dos urediniósporos.

* Comitê de orientação: Prof. Eduardo Alves - UFLA (Orientador); Prof. Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

MEDICE, Regiane. – **Alternative products for the management of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*)** 2007. Cap 1, p.97. Master Degree Dissertation (Master in Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras-MG*.

This research work was carried out with the following objectives: (i) analyze the effects of essential oils of *Corymbia citriodora* 0,1%, *Cymbopogon nardus* 0,05%, *Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* 0,06%, *Thymus vulgaris* and garlic bulb extract 2% (*Allium sativum*) over the germination of urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*; (ii) analyze the efficiency of essential oils, garlic bulb extracts, *Bacillus subtilis* suspension e acibenzolar-S-methyl (ASM) (resistance inducer) as possible alternative products to be used for the control of soybean rust under a green-house environment; (iii) observe the evolution of soybean rust with the treatments composed by essential oils, garlic bulb extract and *B. subtilis* suspension, for field cultivated plants; (iv) observe using Scanning Electron Microscopy (SEM) the effects of essential oils, garlic bulb extracts, *B. subtilis* suspension and ASM over the germination and sporulation of *P. pachyrhizi*. Results obtained by this work showed that, both the essential oils as well as the extracts presented a toxic effect in the experiment testing spore germination when compared to the control and to the positive control (fungicide). For the experiment conducted inside a green-house, with exception for ASM, all the treatments tested were statistically different from the control, according to Scott Knott test at a 95% significance level. In other words, the products reduced the severity of soybean rust. The efficiency of the treatments was also observed by SEM. Both the oils and extracts resulted in wilts and inhibition on the germination of urediniospores of *P. pachyrhizi*. In the bioassay conducted under field conditions, using alternative products, except for the treatment using *Thymus vulgaris* oil. It was observed by means of the area under disease progress curve that all the treatments presented positive results when compared to the control. According to the observations by SEM, in the experiment conducted with detached leaves, it was confirmed that *Cymbopogon nardus*, *C. citriodora*, *M. alternifolia*, *A. indica*, *T. vulgaris* essential oils, garlic bulb extract and *B.subtilis* suspension, resulted in a general wilting of the urediniospores of *P. pachyrhizi*, when compared to the treatment using a commercial fungicide. On the other hand, the treatment using ASM did not interfere in the morphology of the pathogen spores, presenting a similar behavior to the control, allowing normal germination of the urediniospores.

*Supervising Committee: Prof. Eduardo Alves - UFLA (Supervisor); Prof. Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Supervisor).

CAPÍTULO 1

PRODUTOS ALTERNATIVOS NO MANEJO DA FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*) DA SOJA

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie originária da Ásia, aonde vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças às suas características nutritivas, industriais e adaptação a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, seu cultivo se expandiu por todo o mundo e hoje é uma das principais plantas cultivadas. A soja foi introduzida no Brasil pelos primeiros imigrantes japoneses, em 1908, mas, sua introdução é oficialmente considerada como tendo ocorrido em 1914, no Rio Grande do Sul. Porém, a expansão da cultura no país aconteceu apenas nos anos 1970, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional pelo produto.

Os Estados Unidos ocupam a primeira posição entre os países produtores de soja, respondendo por 65,80 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor, respondendo por 45% da área total de plantio. Segundo dados da CONAB (2007), a produção da safra 2006/07 foi de 58 milhões/t, superando em 8,5% a safra de 2005/06, de 53,4 milhões/t. Dos 58,0 milhões de toneladas, a região Centro-Oeste produziu 45,9% (26,6 milhões de toneladas), seguida pela região Sul com 38,2% (22,1 milhões de toneladas), região Sudeste com 7,0% (4,1 milhões de toneladas), região Nordeste com 6,8% (4,0 milhões de toneladas) e Norte com 2,1% (1,2 milhão de toneladas).

Dentre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção de soja, as doenças estão entre os mais importantes. Já são conhecidas mais de cem delas em todo o mundo (Hartman et al., 1999). Algumas atingem níveis de dano econômico e outras passam despercebidas. Dessas, aproximadamente 40, causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, já foram identificadas no Brasil e esse número continua aumentando, com a

expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura (Yorinori & Paiva, 2002).

Das doenças que ocorrem em soja, algumas têm provocado danos expressivos, porém, a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) vem se destacando nos últimos anos no Brasil, devido ao seu alto potencial em provocar danos à cultura (Andrade & Araripe-Andrade, 2002). Estima-se em mais de 60% a área de soja no Brasil atingida pela ferrugem, na safra 2002/2003, resultando em perdas de 112.000 t ou US\$ 24,70 milhões (Yorinori, 2003). Na safra 2003/2004, as perdas foram ainda maiores, chegando a 4,6 milhões de toneladas. Associadas ao que deixou de ser colhido e aos gastos com fungicidas e sua aplicação, as perdas atingem aproximadamente US\$ 2 bilhões (US\$ 266,72/t) (Yorinori & Lazzarotto, 2004). Segundo dados da Embrapa (2007), as perdas em grãos provocadas pela ferrugem asiática da soja somaram 4,5% da safra brasileira em 2006/07, o que equivale a 2,67 milhões de toneladas de grãos.

As estatísticas disponíveis sobre a soja orgânica ainda são precárias e de difícil acesso, devendo-se analisar os números com reservas. No entanto, o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de soja orgânica, superado apenas pelos Estados Unidos, cuja safra é de 25 mil toneladas. Estima-se que 90% da produção seja exportada com prêmios de até 40% sobre o preço da soja convencional (Gazeta Mercantil/Finanças & Mercados, 2005).

O Paraná vem se destacando como o maior produtor nacional de soja orgânica, com uma produção de 16.276 toneladas na safra passada. Os especialistas estimam safra de 30.000 toneladas para 2005 em todo o Brasil, ou seja, 10% da produção mundial. Por isso, pesquisadores do exterior estão interessados em saber como estão sendo desenvolvidas as técnicas de plantio orgânico.

A produção é destinada tanto para atender ao mercado externo quanto o nacional. A grande vantagem é que, além de preservar o ambiente, os produtores obtêm ganhos extras. Enquanto a soja convencional vem sendo negociada a US\$16 a saca, a da produção orgânica é negociada por até US\$24 a saca. A produção orgânica é exportada para os mercados europeu e japonês, mas já começa a ser utilizada no mercado interno para a fabricação de alimentos orgânicos. Além disso, de modo geral, o custo de produção é menor do que no sistema convencional (Embrapa-Soja, 2004).

A soja orgânica é também uma cultura em expansão em Minas Gerais, principalmente em assentamentos (onde se pode agregar valor) e por alguns produtores (Planeta orgânico, 2005), mas ainda não se têm dados estatísticos de quanto está sendo produzido. Entretanto, nos últimos anos, com o aparecimento da ferrugem asiática, o produtor de soja orgânica tem tido grandes problemas, pois variedades resistentes ainda não estão disponíveis e a aplicação de fungicidas, a principal estratégia de controle da doença, não pode ser empregada por esses produtores.

Portanto, torna-se necessário a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo da doença. Uma dessas alternativas é a utilização de óleos essenciais ou extratos de plantas medicinais, os quais têm mostrado resultados promissores no controle de doenças de plantas (Schwan-Estrada et al., 2003).

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Distribuição geográfica

A ferrugem da soja *Glycine max* (L.) Merrill, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow, ocorre no hemisfério leste desde 1902, sendo considerada altamente agressiva, causando danos de 10% a 40% na Tailândia, 10% a 90% na Índia, 10% a 50% no sul da China, 23% a 90% em Taiwan e 40% no Japão (Sinclair & Hartman, 1999).

Sua primeira identificação no Brasil ocorreu em 1979, causando um único surto, com perdas econômicas, registrado em 1987/88, no município de São Gotardo, Minas Gerais (Yorinori, 2002). No Brasil, na safra 2001/2002, a doença incidiu sobre as lavouras de soja, apresentando grande expansão e atingindo os estados do RS, SC, PR, SP, MG, MS, MT e GO (Yorinori, 2003). Na Bolívia e no Uruguai, a ferrugem foi detectada na safra 2002/03, chegando à Colômbia e aos Estados Unidos no ano de 2004 (Reis et al., 2006).

2.2 Etiologia da ferrugem da soja

A ferrugem da soja tem como agentes etiológicos duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*: *P. meibomiae* e *P. pachyrhizi*. A primeira, *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, causadora da ferrugem "americana", é encontrada nas Américas e foi identificada pela primeira vez em Porto Rico, em 1976 (Vakilli, 1978) e no Brasil, em Lavras (MG), em 1979, por Deslandes, segundo Carvalho Júnior e Figueiredo (2000).

Entretanto, se deve ressaltar que o trabalho de Akamatsu et al. (2004) confirmou, por meio de técnicas moleculares, que amostras coletadas no estado de Minas Gerais em 1979, por Deslandes e armazenadas no Instituto Biológico

apresentavam, além de *P. meibomiae*, também *P. pachyrhizi*. Isso confirma a presença dessa espécie já há mais tempo no Brasil.

A ocorrência da doença nas diversas regiões tem variado, com anos de presença bastante visível e anos de ausência. Ela é mais comum no final da safra, em soja safrinha (outono/inverno) e em soja guaxa, estando restrita às áreas de climas mais amenos, localizadas no sul do estado do Paraná e nas regiões altas dos Cerrados (Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais).

A caracterização morfológica da *P. meibomiae* é com base nos seguintes sintomas: telia com 1-4, raramente cinco, camadas de teliósporos com parede cor de canela a castanho-claro, espessura de 1,5-2,0 μm , mas com células da camada apical com até 6 μm nos esporos superiores; esporos anamorfos (urediniósporos) com 16-31 x 12-24 μm , poros germinativos de 6 a 8, às vezes 10, dispersos na zona equatorial e, às vezes, abaixo desta (Ono et al., 1992). Já a segunda, *P. pachyrhizi* causadora da ferrugem "asiática" ou "australiana", está presente na maioria dos países que cultivam a soja.

A caracterização morfológica dessa espécie é a seguinte: telia com 2 a 7 camadas de esporos, parede cor pálida, marrom-amarelada a descolorida, aproximadamente 1 μm de espessura, levemente espessada (-3 μm) apicalmente nos esporos superiores; esporos anamorfos (urediniósporos) com 18-34 x 15-24 μm , poros germinativos de 4 a 6, às vezes 10, mais ou menos dispersos na zona equatorial (Ono et al., 1992). Mais recentemente, a distinção entre essas duas espécies de *Phakopsora* tornou-se possível utilizando-se os *primers* ribossomais derivados da região ITS usados em PCR (Frederick et al., 2002). Em levantamento realizado na safra 2003/2004, utilizando a metodologia de Frederick et al., (2002), Sousa et al. (2007) verificaram que *P. pachyrhizi* praticamente domina as regiões produtoras de soja de Minas Gerais, tendo sido encontrada em 100% das 87 amostras pesquisadas provenientes das várias regiões produtoras do estado.

2.3 O ciclo de vida

O fungo *P. pachyrhizi* é descrito, normalmente, em uredinial e telial. Não se sabe ao certo se ele produz os cinco estágios. Green (1984) não conseguiu observar o estágio 0, a espermogamia e o estágio I, aecial. Apenas foram verificados o estágio II, uredinial e o estágio III, telial, o qual é confundido com o anterior. Os soros urediniais são anfígenos, porém, com maior proporção na face abaxial da folha. Estes, em curto período, se espalham, formando grupos de lesões amareladas.

As télias são de cor castanho a chocolate, subepidérmicas, não erupentes e possuem de 2 a 7 esporos na camada interna (Ono et al., 1992). Em 1991, Saksirirat & Hoppe observaram a germinação do teliósporo (estágio IV), mas não obtiveram sucesso quando o experimento foi repetido. Bromfield (1976) relatou que o papel do teliósporo no ciclo de vida do fungo *P. pachyrhizi* era desconhecido e continua até hoje. Entretanto, em termos de classificação das espécies, essa estrutura tem grande valor.

Yeh et al. (1981) conseguiram desenvolver uma metodologia para a produção de teliósporos em soja e outros hospedeiros, entretanto, são necessários de 50 a 60 dias para o aparecimento deste tipo de esporo. Sousa et al. (2006) conseguiram, em câmaras de crescimento a 15°C, a produção de teliósporos aos 25 e 30 dias após inoculação, nas cultivares Uirapuru e Pintado, respectivamente.

2.4 O modo de penetração

A penetração na folha do hospedeiro é, na maioria das vezes, direta através da cutícula e não pelos estômatos, como a maioria das ferrugens (Koch et al., 1983). Zambenedetti Magnani (2007), utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), verificou que a penetração de *P. pachyrhizi* encontrada em

Minas Gerais é realmente direta e não pelo centro das células da epiderme, como mencionaram Koch et al. (1983), mas, principalmente, nas junções das células.

Para germinar, o urediniósporo precisa formar um tubo germinativo curto, delimitado por um apressório e dividido por septo. O apressório é freqüentemente séssil. Da base deste desenvolve-se a hifa de penetração (mais estreita, *peg*) que penetra pela cutícula do hospedeiro e pela parede da célula da epiderme. A penetração da célula epidermal ocorre 6 horas após a inoculação. Uma vez dentro da célula, a hifa de penetração se expande no espaço intercelular e no tecido do mesófilo. Um septo é formado na porção intercelular da hifa de penetração, enquanto a hifa primária se estende para formar a hifa secundária (Koch et al., 1983). Bonde et al. (1976) verificaram que, 1 a 2 horas após as plantas inoculadas terem sido colocadas em câmara de nevoeiro, à temperatura de 20°C, os urediniósporos iniciaram a germinação e, 2 horas depois os apressórios começaram a se desenvolver e, em 5 horas, muitos apressórios atingiram tamanho semelhante ao dos urediniósporos. Esse tipo de penetração direta é raro em ferrugens, o que torna o patossistema *Phakopsora-soja* de grande valor para estudos ultra-estruturais. Nesse tipo de penetração pode ocorrer uma série de eventos que levam à formação de barreiras estruturais pela planta, as quais podem levar à resistência da mesma ao patógeno.

2.5 Os sintomas

Os primeiros sintomas da ferrugem são minúsculos pontos (máximo 1mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada. À medida que esses pontos evoluem de tamanho na área foliar, passam a serem denominados de “lesões”, porque ocorre a necrose do tecido foliar e cada lesão pode apresentar vários soros urediniais (Reis, et al., 2006). Estas lesões podem aparecer nos pecíolos, nas vagens, nos ramos, porém, são mais abundantes nas folhas, principalmente na superfície inferior.

Com a idade da lesão, os soros urediniais adquirem cor castanho-clara a castanho-escuro e abrem-se em minúsculo poro, expelindo os urediniósporos. Estes, inicialmente de coloração hialina, adquirem cor bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são carregados pelo vento.

O número de soros urediniais por ponto pode variar de um a seis. À medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha ao redor dos primeiros soros urediniais adquire coloração de castanho-clara (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão do tipo reddish-brown ou RB), formando as lesões facilmente visíveis em ambas as faces das folhas entretanto, o maior número de soros urediniais desenvolve-se na face inferior (abaxial) (Reis et al., 2006). Os soros urediniais que deixaram de esporular apresentam-se, nitidamente, com os poros abertos, o que permite distingui-los da pústula bacteriana, que apresenta sintomas semelhantes.

A ferrugem pode também ser facilmente confundida com lesões iniciais de mancha-parda (*Septoria glycines*), formando um halo amarelo ao redor da lesão necrótica angular e castanho-avermelhado. Em ambos os casos, as folhas infectadas amarelam, secam e caem prematuramente (Yorinori, 2003).

2.6 Condições ambientes favoráveis à doença.

Fatores importantes para promover a infecção são temperaturas de 15° a 28°C, umidade relativa de 75%-80%, com precipitação e longos períodos de umidade da folha. A umidade é essencial para a germinação de urediniósporos e seu desenvolvimento. Assim, cinturões de névoa com orvalhos pesados proverão condições satisfatórias para infecção (Kochman, 1979).

Segundo Sinclair & Backman (1989), as epidemias mais severas de ferrugem têm sido observadas em áreas onde as temperaturas médias diárias são menores que 28°C, com precipitações ou longos períodos de molhamento foliar (10 a 12 horas) ocorrendo por toda a safra. Os urediniósporos germinam em três a

seis horas, sob temperaturas de 14°C a 29°C, porém, a germinação e a penetração no tecido da folha podem ocorrer em temperaturas variando de 8°C a 28°C (Hartman et al., 1999).

Em condições de casa de vegetação, sob ausência de luz e a 20°C, urediniósporos de *P. pachyrhizi* iniciam a germinação em uma hora e meia, a partir do momento em que se inicia o orvalho, atingindo o máximo após 6 a 7 horas. Após 8 horas de orvalho e sob temperaturas de 18°C a 26,5°C, a quantidade de lesões é 10 vezes maior do que após 6 horas sob as mesmas temperaturas. Urediniósporos sobre folhas expostas ao período de quatro a seis horas de orvalho, seguido de seca durante quatro dias, são capazes de infectar, sob um período de 12 horas de orvalho, porém, apresentaram 50% ou menos infecção, quando comparados com urediniósporos que não foram expostos ao período inicial de molhamento (Marchetti et al., 1976).

O surgimento das primeiras lesões ocorre sete dias após a inoculação e a produção de urediniósporos secundários inicia-se aos nove dias (Melching et al., 1979). Em estudos realizados em casa de vegetação na Embrapa Soja, em Londrina, PR, observou-se que as primeiras lesões podem ser visíveis 5 a 6 dias após a inoculação e as primeiras frutificações (soros urediniais) podem ser visíveis 6 a 7 dias após a inoculação (Godoy & Canteri, 2004), o que foi confirmado por Zambenedetti (2005).

2.7 O modo de disseminação

Os urediniósporos são facilmente disseminados para lavouras próximas ou a longas distâncias pelo vento. Supõe-se que os esporos do fungo, hoje presentes nas lavouras brasileiras, tenham vindo dos países do sul da África, onde vêm causando perdas severas nos últimos quatro anos, atravessando o oceano Atlântico, em direção ao continente americano ou, mais provavelmente, da Austrália, trazidos por correntes aéreas do Pacífico (Yorinori, 2003).

2.8 Manejo da ferrugem da soja

O manejo das doenças de plantas deve ser empregado para reduzir os danos provocados a níveis economicamente aceitáveis, sem prejuízos para os agroecossistemas, mantendo seu equilíbrio (Zambolim, 1995). Considerando que a ferrugem da soja é uma doença altamente destrutiva e que não houve tempo para pesquisar alternativas de controle, a utilização de fungicidas tem sido a ferramenta mais indicada, no curto prazo. Porém, seu custo é elevado e a decisão de realizar a aplicação deve ser tomada quando do aparecimento dos primeiros sintomas a partir da floração, devendo ser executada rapidamente. Por isso, é necessário que sejam aplicados princípios ativos de amplo espectro e de ação residual duradoura (Reis & Carmona, 2004). Entretanto, se as condições favorecerem a persistência da doença durante um tempo prolongado, podem ser necessárias várias aplicações, de fungicidas.

Contudo, no caso da ferrugem da soja, devido ao número de aplicações, a resistência do fungo aos produtos químicos utilizados para seu controle é uma ameaça que tem preocupado os técnicos envolvidos no controle da doença.

2.9 Produtos alternativos no controle de doenças em plantas

Os agentes causais de pragas e doenças estão cada vez mais resistentes aos defensivos quando estes são utilizados indiscriminadamente.

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 de pragas, nas atividades microbianas no solo, na seleção de organismos resistentes aos pesticidas e alterações das populações de organismos do solo e água, entre outros. Assim, é necessária a busca por métodos alternativos para a proteção de plantas sem o uso de pesticidas (Bettioli et al., 1997; Bettioli et

al., 2005).

Problemas antes considerados secundários passaram a ter importância devido ao desequilíbrio nutricional e ecológico provocado pelos chamados “defensivos agrícolas”. Segundo Plestsch (1998), “as plantas estão doentes pelo excesso de pesticidas”. Na visão de Pontes (2000), o Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e, coincidentemente, é também o terceiro em mortalidade por câncer.

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 poderem induzir resistência (Schwan-Estrada et al., 2003). Com isso, deve-se levar em consideração que o Brasil é um dos países mais ricos do mundo em espécies vegetais e, sendo assim, deve-se buscar fontes de reservas naturais de substâncias ativas sobre patógenos da agricultura.

Para a agricultura orgânica e para a preservação e o equilíbrio do meio ambiente, está é uma das principais saídas para o controle de doenças que afetam e causam prejuízos aos produtores.

2.10 Atividade biológica dos produtos naturais

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em óleos essenciais ou extratos brutos de plantas pode se constituir em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas. Os óleos essenciais apresentam ampla distribuição em vegetais superiores. Teuscher (1990) verificou a presença desses óleos em 30% das espécies investigadas.

Os óleos essenciais são obtidos, normalmente, por destilação de flores, folhas, cascas e sementes de plantas aromáticas. Apesar de serem chamados de óleos, se parecem mais com álcoois, pois se evaporam rapidamente quando

expostos ao ar à temperatura ambiente. São chamados ainda de óleos voláteis ou etéreos, os quais podem atuar de duas formas sobre o controle de fitopatógenos. A primeira é por meio da indução de resistência em plantas a patógenos, o que leva a planta à formação de barreiras estruturais ou químicas. A segunda é por meio da ação fungistática e ou fungicida direta sobre os fitopatógenos.

Os extratos vegetais são compostos obtidos pela da imersão de material vegetal em metanol (extrato alcoólico) ou através da prensagem do material em água. Essa mistura é filtrada, dando origem ao resíduo e ao filtrado. Este filtrado é utilizado como extrato e tem composição química diversa, bem diferente de um óleo essencial.

Bianchi et al. (1997) utilizaram o extrato aquoso de alho nas concentrações de 10mL.L⁻¹ e 100mL. L⁻¹ e verificaram a ocorrência de alterações morfológicas, respectivamente, nas hifas de *Pythium ultimum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. 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 atividade contra todos os microrganismos testados, como *Saccharomices cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *Cryptococcus neofarmans*.

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos e óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial desses 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 em *Allium sativum* (alho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Artemísia camphorata* (cânfora) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (Schwan-Estrada et al., 2003).

Experimentos realizados com plantas medicinais têm detectado a presença de compostos fungitóxicos utilizando cromatografia delgada. Stangarlin

et al. (1997, 1999) verificaram a presença de frações capazes de inibir o desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola*, bem como também a presença de duas frações fungitóxicas bem definidas nos extratos de erva cidreira e uma nos de cânfora e alfavaca. Diniz et al. (2000) verificaram que óleos essenciais de tomilho, estragão, manjerição roxo, manjerona e menta citrata foram capazes de inibir o crescimento de *Sclerotinia minor*, em placas de Petri. Rios et al. (2003) observaram, *in vitro*, que o extrato de citronela nas concentrações de 5%, 10%, e 15% reduziu parcialmente o crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum acutatum*, enquanto que, na concentração de 20%, ocorreu inibição total desse crescimento.

Óleos essenciais de *Corymbia citriodora*, *Corymbia urophylla* e *Eucalypto camaldulensis* inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea* utilizando uma concentração de 500 ppm, enquanto que, nas concentrações de 5 e 50 ppm, houve diferença significativa no crescimento micelial (Salgado,2001).

Outra planta que vem despertando o interesse de pesquisadores é a *Azadirachta indica*, mais conhecida como nim. Em ensaios realizados com óleo dessa planta para o controle de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura de bruxa em cacau, houve total inibição no crescimento do micélio, mesmo em baixas concentrações (1%). Medice (2007) verificou que *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica* e *Thymus vulgaris*, nas concentrações 1%, 0,5%, 1% e 0,3%, respectivamente, foram capazes de inibir a germinação *in vitro* de *P. pachyrhizi* e de reduzir a severidade da ferrugem entre 34,3% e 62,6%, em casa de vegetação.

Marcano et al. (2005), em ensaio *in vitro* utilizando extrato de alho, nim e Benomyl, para avaliar o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* e *Thielaviopsis basicola*, concluíram que os tratamentos com extrato de alho e de nim foram mais eficientes do que o benomyl na redução no número de

esclerócios e todos os tratamentos reduziram o crescimento micelial, além de inibir a germinação de conídios de *Thielaviopsis basicola*. Dessa forma, os extratos de plantas demonstram alto potencial no controle de patógenos.

2.11 Indução de resistência por meio do uso de óleos essenciais e extrato de plantas medicinais

Todas as plantas possuem potencial genético para resistência a fitopatógenos e a diferença entre resistência e suscetibilidade está na velocidade e magnitude de expressão desse potencial. Foi demonstrada, experimentalmente, a possibilidade da expressão desses genes ser manipulada, alterando o estado de suscetibilidade para resistência por vários agentes bióticos ou abióticos (Kúc, 1995), fenômeno conhecido por (resistência sistêmica adquirida ou SAR) (Sticher et al., 1997). A resistência induzida tem sido verificada em diversas plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (Schneider et al., 1996).

Numa visão geral do processo de resistência sistêmica induzida, o fenômeno pode ser comparado com a imunização de animais e de seres humanos em seus efeitos finais de proteção, ainda que os mecanismos sejam totalmente diferentes, em sua natureza (Romeiro, 1999).

Baseados nessa teoria, Guzzo et al. (2001) avaliaram a eficiência de acibenzolar-S-methyl (produto comercial Bion[®]) contra *Hemileia vastratrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro. Os resultados foram surpreendentes, evidenciando que o produto agiu como um indutor de resistência, reduzindo a incidência da ferrugem em até 90%, nas plantas previamente tratadas.

Plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta), como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação antimicrobiana indireta). Na literatura, é possível encontrar inúmeros trabalhos que utilizam as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários de plantas medicinais para o controle

de agentes fitopatogênicos, utilizando o extrato bruto ou o óleo essencial dessas plantas (Stangarlin et al., 1999).

Neste sentido, algumas plantas se destacam, como é o caso de *Artemísia camphorata* Vill. (cânfora), de propriedades medicinais. As folhas dessa planta possuem 0,8% de óleo essencial constituído por mais de 60% do composto terpenóide linalol (Martins et al., 1995). Extrato bruto e óleo essencial de cânfora têm mostrado resultados satisfatórios na inibição do crescimento micelial de alguns fungos (Soares et al., 1998a,b; Stangarlin et al., 1997), bem como na indução de fitoalexinas em sorgo e soja (Schwan-Estrada et al., 1997).

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado a viabilidade de isolados de *Bacillus subtilis* controlarem biologicamente doenças da parte aérea. Baker et al. (1985) verificaram redução na severidade da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em, pelo menos, 75%, em 1982 e 1983, com três aplicações por semana de *B. subtilis*, cujo nível de controle foi comparável ao obtido com o fungicida mancozeb, aplicado uma vez por semana. Kupper & Fernandes (2002) verificaram, em laboratório, que 33 isolados de *Bacillus* spp testados em lima ácida 'Tahiti' contra *Colletotrichum acutatum* apresentaram eficiência de controle acima de 90%, comparados à testemunha e as flores destacadas, aplicadas com 11 isolados, apresentaram 100% das pétalas sem sintomas de *C. acutatum*.

Como se pode observar a maioria dos trabalhos com óleos, extratos, indutores de resistência e agentes de biocontrole é realizado *in vitro*. Poucas informações são disponíveis em condições de casa de vegetação e campo.

2.12 A microscopia aplicada no estudo de fungos e sua interação com plantas

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência da hospedeira ocorre na célula, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais

modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas, sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para se visualizar tais processos de infecção os microscópios de luz (ML), eletrônico de transmissão (MET) e eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições. Esses microscópios são importantes ferramentas para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses agentes.

A ultra-estrutura de fungos é também bem documentada na literatura. Beckett et al. (1974) mostram exemplos da ultra-estrutura de vários fungos. Na obra Littlefield e Health (1979), a ultra-estrutura dos fungos causadores de ferrugens é tratada com detalhes, inclusive com diferenças ultra-estruturais entre algumas espécies.

No caso da ferrugem da soja, essas técnicas têm sido utilizadas há bastante tempo. McLean e Byth (1980) estudaram os eventos de pré-penetração e de penetração de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em cultivares suscetíveis, resistentes e altamente resistentes ('Tainung-3', 'Tainung-4' e 'PI-200492'). Em todas as cultivares, não foram encontradas diferenças em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo, mas sim na porcentagem de urediniósporos germinados, formação de apressório e penetração. As cultivares Tainung-3 e Tainung-4 foram resistentes à germinação dos urediniósporos, portanto, a resistência desses cultivares é de pré-penetração e penetração e a cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos urediniósporos, pois germinaram e penetraram no tecido do hospedeiro, mas não conseguiram se desenvolver. Portanto, essa resistência ocorre na fase de pós-penetração.

Outros fatores importantes na resistência dos cultivares são as substâncias químicas e a topografia das folhas. Allent et al. (1991) aplicaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) para estudar estes

fatores em 27 espécies de fungos causadores de ferrugem e, dentre esses, *P. pachyrhizi*. Eles perceberam que, em locais da folha nos quais as diferenças no plano topográfico atingiam aproximadamente 0,4-0,8µm, o fungo se desenvolvia muito bem e, em locais de depressão, nos quais as diferenças eram inferiores ao número acima, a formação de apressório era reduzida. Esses fatores estão diretamente ligados à orientação e ao crescimento do tubo germinativo.

Bonde et al. (1976) e Koch et al. (1983) utilizaram ML, MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos nessa interação. Mais recentemente, 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 ao de *P. pachyrhizi*.

A importância da ML e MEV para a classificação de espécies de ferrugem pôde ser comprovada no trabalho de Ono et al. (1992), que delimitaram as espécies dos gêneros *Phakopsora*, *Physopella* e *Cerotelium*, que afetam as fabaceas, dentre elas *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from urediospores of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, v. 104, p.317-324, 2000.

AKAMATSU, M. A.; BARRETO, M.; AKAMATSU, R. Detecção e distinção de *Phakopsora pachyrhizi* e *P. meibomia* em amostras do Herbário Uredinológico do Instituto Biológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 277-278, ago. 2004. Suplemento.

ANDRADE, P.J.M.; ARARIPE-ANDRADE, D.F.A. **Ferrugem asiática: uma ameaça a sojicultura brasileira**. Londrina: Embrapa Agropecuária Oeste, 2002. 11p. (Circular Técnica, 11).

ALLEN, E.; HAZEN, B.; HOCH, C.; KWON, Y.; LEINHOS, G.M.E.; STAPLES, R.C.; STUMPF, M. A.; TERHUNE, B.T. Aposporium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, v.81, n.3, 323-331, 1991.

BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 9, p. 770-772, 1985.

BECKETT, A. et al. **An atlas of fungal ultrastructure**. London: Longman, 1974.

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

BETTIOL, W.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Controle, com matéria orgânica, do tombamento do pepino, causado por *Pythium ultimum* Trow. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 57-61, jan. 1997.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; D'AURELIO, A. Z.; BALLESA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi "in vitro". **Plant Disease**, v. 81, n.11, p.1241-1246, 1997.

BONDE, M.R.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 4, p.1290-1294, 1976.

BROMFIELD, K.R. World soybean rust situation. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE DANVILLE, **Proceedings...** Danville. The Interstate, p.491-500,1976.

CARVALHO JÚNIOR, A. A.; FIGUEIREDO, M. B. A. Verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 197, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 09 mai. 2007.

DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 337-339, 1979.

DINIZ, S. P. S. S.; UNTUM, H.; KAZANKI, L. I. B.; QUEIROZ, M. C. Ocorrência do fungo *Esclerotinia* em raízes de Estevia (*Stave reabaudiana* Bert) e controle por óleos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p.369, ago. 2000. Resumo.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – SOJA. **Soja o grão mágico**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br>>. Acesso em: 14 out. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – SOJA. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nesta safra**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/alerta/>>. Acesso em: 01 jul. 2007.

FAWCETT, C. H.; SPENCER, D. M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 403-417, 1970.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the

soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 217-227, 2002.

GAZETA MERCANTIL / FINANÇAS & MERCADOS. **Ferrugem ameaça lavouras orgânicas.** Disponível em:

<<http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?id=1342>>. Acesso em: 02 jan. 2005.

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

GREEN, A. Soybean rust. USDA-APHIS-PPQ, 1984. n.56.

GUZZO, S. D.; CASTRO, R.M.; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do Acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.89-94, jan./jun. 2001.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases.** APS, 1999.

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**. v.106, p.302-320, 1983.

KOCHMAN, J. K. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal Agriculture Res.**, v.30, p.273-277, 1979.

KUC, J. Systemic induced resistance. In: WALTERS, D.R.; SCHOLLES, J.D.; BRYSON, R.J.; PAUL, N.D.; MCROBERTS, N. (Ed.). **Aspects of applied biology: physiological responses of plants to pathogens.** Dundee: Association of Applied Biologists, 1995. v. 42, p. 235-242.

KUPPER, K. C. et al. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 3, p. 292-295, 2002.

LEMONS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVERO, A. A.; CLARK, A. M.; Mc CHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytoterapy Research**, Chichester, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LITTLEFIELD, L. J.; HEALTH, M. C. **Ultrastructure of rust fungi**. Toronto: Academic, 1979. 275 p.

MARCANO, A. D.; VARGAS, N.; PIRE, A. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* e *Thielaviopsis basicola*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v. 22, n. 4, p.315-323, 2005.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v. 66, n.3, p. 461-463, 1976.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 31, p. 951-956, 1980.

MEDICE, R.; ALVES, E.; MAGNO JUNIOR, R. G. ; ASSIS, R. T. ; LEITE LOPES, E. A. G. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n.1 p. 83-90, 2007.

MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R.; KINGSOLVER, C.H. Infection, colonization and uredospores production on Wayne soybean by four cultures of *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v. 69, p. 1262-1265, 1979.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycology Res**, v.96, p.825-850, 1992.

PLANETA Orgânico. **Soja orgânica em Minas Gerais**. 2005. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/minas.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2005.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 4, p.12-15, 1998.

PONTES, J. J. Um basta aos agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS ALTERNATIVOS, 1., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Academia Cearense de Ciências, 2000. p. 9-12.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMON, M. **Doenças da soja I: ferrugem Asiática.** Passo Fundo, RS: Universidade Federal de Passo Fundo, 2006. 48 p.

REIS, E. M.; CARMONA M. **La roya de la soja.** Buenos Aires, 2004. 20 p.
RIOS, S. A.; CANUTO, R. S.; RIBEIRO, JR., P. M. S.; SOUSA, L. T.; SANTOS, L. O.; SILVA, J. J. C.; NORMANHA, R. A.; PEREIRA, M. R.; DIAS, M. S. C. Inibição do crescimento Micelial de *Colletotrichum acutatum* S. mmonds, agente causal da Flor Preta do morangueiro (*Fragaria X ananassa* Dulch) com extrato de citronela (*Cimbopogon sp*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 360, 2003. Resumo.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos.** Viçosa, MG: UFV, 1999.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). **Journal of Phytopathology**, v.132, p. 339-342, 1991.

SALGADO, A. P. S. P. **Estudos dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus*.** 2001. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCHNEIDER, M.; SCHWEIZER, P.; MEUWLY, P.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance in plants. **International Journal of Cytology**, San Diego, v. 168, p. 303-340, 1996.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 54-56s, 2003b.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 346, 1997. Suplemento.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases.** 3.ed. Minnesota: APS, 1989.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L., SINCLAIR, J. B.; RUPE, J.C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases.** 4.ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1999. p.25-26.

SOARES, R. N. et al. Potencial de *Artemisia camphorata* (cânfora) no controle de *Sclerotium rolfsii* em casa-devegetação. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7., 1998, Maringá. **Anais...** Maringá, PR: UEM, 1998a. p. 557.

SOARES, R. N. et al. Potencial de *Artemisia camphorata* (cânfora) no controle de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 284, 1998b. Suplemento.

SOUSA, P. F. C.; ALVES, E.; CASTRO, H. A.; SOUZA, P. E.; ALMEIDA, A. M. R.; HOCHENBACH, S. R. Distribuição e identificação de *Phakopsora pachyrhizi*, agente da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 672-677, 2007.

SOUSA, P. F.; ALVES, E.; CASTRO, H. A. Influência da temperatura no desenvolvimento de teliósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n.3, p. 227-231, 2006.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F.; CRUZ, M. E. S. Efeito de frações fungitóxicas de extrato bruto de plantas medicinais no crescimento de *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 346, 1997. Resumo.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische Biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. **Phytopathology**, v. 71, n. 1, p. 1111-1112, 1981.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002. **Anais...** Foz do Iguaçu, p.171-186,2002.

YORINORI, J. T. Ferrugem asiática da soja: doença recente e preocupante. **Correio Agrícola**, v. 1, p. 16-21, 2003.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul.** Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27 p. (Documentos, 236).

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow.** Londrina: Embrapa Soja, 2002. Folder.

VAKILLI, N. G. Field observations and host range of soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* in Puerto Rico. In: WORK SHOP ON SOYBEAN RUST IN THE WESTERN HEMISPHERE, 1978, Porto Rico. **Proceedings...** Porto Rico: Mayaguez Institute of Tropical Agriculture, 1978.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) merril).** Dissertação. 2005,92p (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, MG.

ZAMBENEDETTI MAGNANI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 156- 160, 2007.

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

CAPÍTULO 2

ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATO DE BULBOS DE ALHO (*Allium sativum* L) NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO

MEDICE, Regiane. Óleos essenciais e extrato de bulbos de alho (*Allium Sativum* L) na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: _____ **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja** 2007. Cap 2, p 26-37. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática da soja, na presença de óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) 0,1%, *Cymbopogon nardus*, (citronela) 0,05%, *Azadirachta indica*. (nim) 0,1%, *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) 0,06%, *Thymus vulgaris* (tomilho) e extrato de bulbos de alho 2% (*Allium sativum*). O ensaio foi realizado *in vitro*, no qual os produtos foram incorporados ao meio ágar-água, tendo como controle positivo um fungicida e uma testemunha. O inóculo foi obtido em casa de vegetação de plantas com sinais do patógenos mantidas como fonte para a realização do ensaio. Os esporos foram retirados com pincel e separados com peneira de 60 mesh. Logo após, foi preparada uma suspensão em 10 mL de água destilada e duas gotas de Tween 20%, levando-se ao agitador por alguns minutos. Após a solidificação do meio, foram depositados 200µL da suspensão de esporos e de cada tratamento e espalhados com alça de Drigalsky. Depois desse procedimento, as placas foram identificadas e acondicionadas em câmara de crescimento, a 25°C, em delineamento experimental ao acaso, por um período de quatro horas e meia, após o qual, cessou-se a germinação com lactofenol. As avaliações foram realizadas em microscópio de luz utilizando-se a objetiva de 10x, cujas placas foram divididas em 4 quadrantes e contados 25 esporos, totalizando 100 esporos. Foram considerados germinados aqueles que apresentavam tubo germinativo superior ao esporo. Constatou-se que os tratamentos inibiram a germinação em até 100%, o que indica que os produtos utilizados neste ensaio apresentam potencial para o controle da ferrugem asiática em soja.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves - UFLA (Professor Orientador); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

MEDICE, Regiane. Effects of essential oils and Garlic bulb extract (*Allium Sativum* L) over *Phakopsora pachyrhizi* spore germination. In:_____ **Alternative Products to Control Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*)**, 2007.Cap 2, p....MSc. Dissertation (Master Degree in Plant Pathology) – Lavras Federal University, Lavras-MG - Brazil*.

The aim in the present research work was to evaluate the rate of spore germination in *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Soybean Rust disease, in the presence of essential oils of *Corymbia citriodora* (citriodora eucalyptus) 0,1%, *Cymbopogon nardus* 0,05%,*Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* 0,06% ,*Thymus vulgaris* L. (tomilho) as well as garlic bulb extract 2% (*Allium sativum* L.). The research work was conducted under *in vitro* conditions, incorporating the products tested, with water – agar medium, having as positive controls one fungicide and an absolute control. The inoculums were obtained from plants being maintained inside a controlled greenhouse. The spores were extracted from the leaves using a soft brush and separated by a 60 mesh sieve. A 10 mL suspension was prepared with distilled water and two drops of 20 % tween solution. After having being prepared the suspension were agitated during a few minutes. After having solidified the media with the treatments, a 200µL aliquot of the spore suspension was poured over its surface and spread with a Drigalsky spatula. After this procedure, the Petri dishes were identified and conditioned inside controlled growth chambers at a 25°C temperature regime during a four and a half hour period, in a complete random experimental design. After this period, germination was paralyzed with lactophenol. The evaluations were conducted with a light microscope using a 10x objective lens, having divided the Petri dishes in four equal quarters, counting 25 spores in each, totalizing 100 spores. Only the spores which presented the length of the germination tube superior to the actual size of the spore were considered to be germinated. It could be observed that the treatments were able to inhibit up to 100% of the spore germination, which indicates that the products tested, present a high potential to be used in the control of Soybean Rust.

*Supervising Committee: Prof. Eduardo Alves - UFLA (Supervisor); Prof. Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Supervisor).

1 INTRODUÇÃO

Na safra 2001/2002 foi verificada, no país, uma epidemia em soja, denominada ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tornando-se um potencial problema para a sustentabilidade do agronegócio nacional.

A doença ocorre principalmente nas folhas, fazendo com que elas caiam antes do tempo, comprometendo a produção de fotoassimilados, com conseqüente redução na produtividade.

Considerando que a ferrugem asiática da soja é de uma doença altamente destrutiva e que não houve tempo para pesquisar alternativas de controle, a utilização de fungicidas ainda tem sido a ferramenta mais indicada no curto prazo. Porém, seu custo é elevado e a decisão de aplicá-los deve ser tomada quando do aparecimento dos primeiros sintomas a partir da floração, devendo o produtor realizá-lo rapidamente.

Entretanto, se as condições favorecerem a permanência da doença durante um tempo prolongado, podem ser necessárias várias aplicações de fungicidas. Esse elevado número de aplicações pode levar o fungo a adquirir resistência aos produtos químicos utilizados para seu controle, o que representa uma ameaça e tem preocupado os técnicos envolvidos no controle da doença.

Atualmente, uma das alternativas pesquisadas para reduzir a aplicação dos fungicidas envolve o uso de produtos alternativos, tais como óleos essenciais de plantas medicinais e extratos vegetais, buscando explorar suas propriedades fungitóxicas. A literatura tem registrado a eficiência de extratos obtidos de uma gama de espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (Wilson et al., 1997; Kurita et al., 1981).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de plantas medicinais da flora nativa, 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 e outros compostos de defesa, indicando a presença de compostos com característica de elicitor.

Alves et al. (2003) relataram a eficiência dos monoterpenos citral, citronelal e dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*, *C. nardus* e *Eucalyptus citriodora* no controle *in vitro* da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotrichum musae*. Medice et al. (2007) verificaram, *in vitro*, que óleo essencial de *Cymbopogon nardus* a 0,5% foi suficiente para inibir em 100% a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

A fungitoxicidade do extrato de alho sobre a germinação de esporos de fungos tem sido relatada em vários trabalhos. Bastos (1992) e Wilson et al. (1997) relataram a capacidade fungitóxica do extrato, diminuindo a germinação de esporos sexuados e de conídios de uma gama de fungos patogênicos a plantas. Em ensaios realizados por Bolkan e Ribeiro (1981), observou-se que houve inibição do crescimento micelial de *Rhizotonia solani* e *Fusarium moniliforme* por meio de extratos de folhas de alho. Os mesmos autores testaram o bulbo e observaram redução na dosagem em mais de 50% com inibição total da germinação dos conídios de *Cylindrocladium clavatum*.

Portanto, espera-se que a descoberta de substâncias naturais com efeito fungitóxico possa contribuir no controle da ferrugem asiática em soja.

Nesse contexto, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar a atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* e extrato de *Allium sativum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O experimento foi realizado nos laboratórios de Diagnose e Controle de Enfermidades em Plantas e de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, MG.

2.2 Obtenção dos produtos utilizados no experimento

Os óleos essenciais e o fungicida utilizados neste trabalho foram adquiridos em um estabelecimento comercial especializado em produtos naturais da cidade de Lavras, MG.

2.3 Obtenção do extrato de alho

Os bulbos de alho para a obtenção do extrato foram adquiridos em estabelecimentos comerciais, pesados na proporção de 100g e triturados em processador doméstico. Foram, então, acondicionados em um recipiente contendo uma colher de óleo mineral e 100 mL de água destilada por, aproximadamente, 12 horas. Logo após esse descanso, a mistura foi filtrada em peneira para separar o alho triturado da calda.

2.4 Obtenção e preparo do inóculo

O inóculo foi obtido em plantas da cultivar Conquista MG 46 mantidas em vasos acomodados em casa de vegetação e inoculadas com isolados de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes da área experimental da UFLA.

Destacaram-se folhas com sinais do patógeno e, logo após, com pincel, retiraram-se os esporos, em uma bandeja de plástico protegida com papel alumínio.

Após a extração, esses esporos foram passados por uma peneira de 60 mesh, para separar os urediniósporos das impurezas.

Os esporos foram pesados na proporção de 0,05 mg, suspensos em 10 mL de água destilada, adicionando-se, ainda, uma gota de Tween 20% e levados ao agitador por alguns minutos (Zambenedetti, 2005).

2.5 Inibição da germinação dos urediniósporos

Para realizar os testes, utilizaram-se placas de Petri de plástico com seis cm de diâmetro, foram depositados 9 mL de meio de cultura ágar-água e, sobre este, ainda em estado líquido, incorporou-se 1mL dos tratamentos com óleos essenciais e extrato de alho nas respectivas concentrações: *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) 0,1%, *Cymbopogon nardus* (citronela) 0,05%, *Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) 0,06%, *Thymus vulgaris* (tomilho) 0,03% e um fungicida à base de piraclostrobina e epoxiconazole, marca comercial Opera[®], a 0,2%, como controle positivo do ensaio.

No tratamento com o extrato de alho incorporaram-se 2 mL do extrato em 8 mL de meio agar-água, na concentração de 20%. Um mililitro de água destilada foi adicionado nas placas controles. Deve-se ressaltar que as diluições dos óleos e extrato, quando incorporados ao meio neste ensaio, tinham a concentração final dez vezes menor que a inicial. Após a solidificação do meio, com micropipeta, foram depositados 200 µL da suspensão de urediniósporos na concentração de 0,05 mg de esporos por 10 mL de água destilada, a qual foi espalhada com alça de Drigalsky sobre a placa.

O experimento foi realizado com três repetições, ou seja, três placas para cada tratamento. Depois de inoculadas as placas foram levadas para câmara de germinação, a 25°C no escuro e, ao final de 4 horas e meia, procedeu-se à

interrupção do processo germinativo, utilizando-se duas gotas de lactofenol, espalhada com alça de Drigalsky. Em seguida, realizou-se a avaliação por meio da contagem do número médio de esporos germinados e não germinados.

2.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo oito tratamentos e três repetições. Cada repetição constou de uma placa de Petri, dividida em 4 quadrantes e contados 25 urediniósporos por quadrante, num total de 100 esporos para cada placa. A contagem foi realizada em microscópio de luz, utilizando objetiva de 10x. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentavam tubo germinativo com tamanho superior ao do esporo.

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software estatístico Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inibição da germinação dos esporos

Pode-se observar, pelos dados da Tabela 1, que os tratamentos com óleos essenciais, extrato de bulbos de alho e fungicida como controle positivo inibiram a germinação dos esporos de *P. pachyrhizi*, quando comparado ao tratamento controle, em que a porcentagem de germinação de esporos foi, em média, de 94,67%.

Verificou-se que para todos tratamentos, ou seja, os óleos essenciais de eucalipto citriodora, citronela, melaleuca, nim, tomilho e extrato de bulbos de alho, o percentual de germinação, comparado ao controle positivo (fungicida), não diferiu estatisticamente, mas diferiu da testemunha (Tabela 1).

TABELA 1: Efeito *in vitro* de óleos essenciais e extrato de bulbos de alho sobre a inibição da germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

Tratamentos	% de esporos germinados	Esporos germinados*
Citronela	0,00	1,00 ± 0,00 a
Melaleuca	0,33	1,44 ± 0,24 a
Eucalipto	0,67	1,28 ± 0,24 a
Nim	1,00	1,38 ± 0,37 a
Alho	2,00	1,72 ± 0,29 a
Tomilho	2,00	1,67 ± 0,58 a
Fungicida	0,00	1,00 ± 0,00 a
Testemunha	94,67	9,78 ± 0,16 b

*Dados transformados para $(x + 1)^{0,5}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade.

Resultados similares foram apresentados por Bonaldo et al. (1998). Utilizando extrato bruto de *Corymbia citriodora* na concentração de 10%, esses autores verificaram redução de 14% a 34% na formação de apressórios de *Colletotrichum graminicola*, Entretanto, houve um estímulo à germinação dos conídios.

Bolkan e Ribeiro (1981) confirmaram, em seu trabalho, a ação do extrato de bulbo de alho, inibindo o crescimento micelial da *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Cylindrocladium clavatum* na ordem de 66,9%, 76,3% e 37,6% respectivamente. Já neste trabalho, a ação do extrato de bulbo de alho teve eficiência de 100%.

As pesquisas *in vitro* realizadas até o momento indicam o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos (Schwan-Estrada et al., 2003). Almeida et al. (2006), utilizando óleo essencial de citronela (*Cymbopogon citratus*) e extrato de jurubeba (*Solanum paniculatum*) e alho (*Allium sativum*) sobre o fungo *Colletotrichum musae* em teste *in vitro*, constataram que, mesmo com a menor concentração (0,25%), ocorreu 100% de inibição, efeito semelhante ao observado no extrato de alho. A jurubeba inibiu em 62,3% o crescimento micelial do fungo.

No presente trabalho, os resultados obtidos *in vitro* tornam mais abrangente o potencial referido por aqueles autores, indicando existir evidências experimentais significativas para encorajar investigações sobre o uso de óleos essenciais e extrato de plantas no combate das doenças em plantas.

3 CONCLUSÃO

Verificou-se efeito dos óleos essenciais e do extrato de bulbos de alho na emissão do tubo germinativo de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, cujos produtos se apresentam promissores no controle da ferrugem asiática da soja, uma vez que chegam a inibir em até 100% a germinação dos urediniósporos, quando testados *in vitro*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. T. et al. Efeito de óleo essencial e extratos vegetais no controle do *Colletotrichum musae* “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 197, ago. 2006.

ALVES, E. S. S.; PUPO, M.S.; MARQUES, S. S.; ILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VEENTURA, J. A.; FERNANDES, M. P. M. Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.343, 2003.

BASTOS, C. N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.454-457, 1992.

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *Suglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 565-566, 1981.

BONALDO, S. M. **Fungitoxicidade, indução de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em pepino a *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora***. 2001. Tese (Mestrado)-Universidade Federal de Maringá.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 945-952, 1981.

MEDICE, R.; ALVES, E.; MAGNO JUNIOR, R.G.; ASSIS, R.T.; LEITE LOPES, E. A. G. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n.1, p. 83-90, 2007.

REIS, E. M.; CARMONA M. **La roya de la soja**. Buenos Aires, 2004. 20 p.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28. p. 54, 2003.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) merril)**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WINIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 204-210, 1997.

CAPÍTULO 3

PRODUTOS ALTERNATIVOS PARA O CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA EM CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

MEDICE, Regiane. Produtos alternativos para o controle da ferrugem asiática da soja em casa de vegetação. In:_____ **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja**, 2007.Cap 3, p.39-63.Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG*.

No manejo de doenças de plantas é fundamental integrar medidas de controle para viabilizar a produção, principalmente em cultivos orgânicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de vários produtos alternativos com potencial no controle do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente da ferrugem asiática em soja. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-MG. Utilizou-se a cultivar MGBR-46 (Conquista). Os ensaios constaram de 10 tratamentos (sendo cinco óleos essenciais, o extrato de bulbos de alho, a suspensão de *Bacillus subtilis*, um fungicida (piraclostrobina e epoxiconazole), acibenzolar-S-methyl e água. Realizaram-se três aplicações com óleos essenciais de eucalipto citriodora (0,1%), citronela (0,05%), melaleuca (0,06%), nim (0,1%) e tomilho (0,03%), extrato de bulbos de alho (20%) e suspensão de *Bacillus subtilis* (10^8 ufc/mL). Os parâmetros avaliados foram presença e número de lesões por cm² de área foliar. A partir da segunda avaliação, coletaram-se folhas para a preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura, cujo objetivo foi o de acompanhar os efeitos dos óleos sobre as estruturas do fungo na planta. Os dados obtidos para controle da severidade foram submetidos ao teste de Scott-Knott, com grau de confiança de 95%. Foi possível constatar que, quando aplicado *in vivo*, os óleos essenciais de eucalipto citriodora, citronela, melaleuca, nim e tomilho e os extratos de bulbo de alho e de *Bacillus subtilis* retardaram a evolução da doença, quando comparados ao controle. Entretanto, verificou-se que acibenzolar-S-methyl não induziu resistência contra a doença. Nas observações em MEV, constatou-se murchamento dos urediniósporos tratados com os óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e suspensão de *B. subtilis*. Com isso, pode-se inferir que os produtos utilizados neste trabalho apresentam potencial para reduzir o ataque do patógeno.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves - UFLA (Professor Orientador); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

MEDICE, Regiane. Alternative Products to Control Soybean Rust under green-house conditions. In: _____ **Alternative Products to Control Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*)**, 2007. Cap 3, p.39-63. Master Degree (Plant Pathology MSc)-Federal University of Lavras, Lavras-MG*, Brazil.

In plant organic cultivation systems, it is of fundamental importance that different disease management measures be used to produce reasonable control besides making production viable. The aim in this research work was to screen the potential effect of various alternative products to be used in the control of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Soybean Rust. The experiment was conducted inside a controlled green-house of the Plant Pathology Department at Lavras Federal University. Soybean MGBR-46 (Conquista) cultivar was used as the plants tested. The experiment was composed by 10 treatments (five different essential oils, garlic bulb extracts, *Bacillus subtilis* extracts, a commercial fungicide, named Acibenzolar-S-Methy and water). Three applications of *Corymbia citriodora* 0,1%, *Cymbopogon nardus* 0,05%, *Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* 0,06%, *Thymus vulgaris* (0,03%) plant essential oils and garlic bulb extract 20% (*Allium sativum*) and *B. subtilis* extract (10^8 ufc/mL) were tested. The response variable analyzed was the frequency of pustules per cm^2 in the leaf area. From the second evaluation onwards, leaves were collected to be submitted to scanning electron microscopy (SEM), aiming to follow up the effects of the different oils over the fungal structures on the plant. The control data related to severity were submitted to Scott-Knott statistical test, with a 95% degree of confidence. It was possible to confirm that when the *C. nardus*, *C. citriodora*, *M. alternifolia*, *A. indica*, *T. vulgaris* essential oils and garlic bulb extract and *Bacillus subtilis* suspension when applied *in vivo*, they were able to retard the development of the disease when compared to the control plants. Nevertheless, it was observed that acibenzolar-S-Methyl did not act as disease resistance inducer against soybean rust. In the SEM observations it was possible to see uredinospores wilting, when treated with the essential oils, garlic bulb extract and *B. subtilis* suspension. By the results obtained it can be inferred that the product tested present a potential to reduce the attacks by the pathogen.

* Supervising Committee: Eduardo Alves - UFLA (Supervisor); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Supervisor).

1 INTRODUÇÃO

A exploração comercial de muitas espécies em sistema orgânico é dificultada pela ocorrência de doenças e pragas e limitação no uso de pesticidas.

O cultivo da soja, uma das principais culturas produzidas no Brasil, no sistema convencional, demanda grande quantidade de insumos e uso intensivo de agrotóxicos. Em sistemas orgânicos, os riscos de perdas são maiores, pois poucos insumos são permitidos ou conhecidos para o manejo fitossanitário. Uma das doenças mais destrutivas da soja é a ferrugem asiática, cujo agente etiológico é o fungo basidiomyceto *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow.

Em condições favoráveis ao desenvolvimento e sem adoção de medidas de controle da ferrugem, perdas totais de produção podem ocorrer em curto período de tempo. Atualmente, não há cultivares de soja com boas características agronômicas e resistência duradoura ao fungo, e seu controle baseia-se, quase que exclusivamente, no uso de fungicidas.

No manejo de doenças de plantas, é fundamental integrar medidas de controle para viabilizar a produção, principalmente em cultivos orgânicos. Nesses cultivos, o uso de caldas, extratos, biofertilizantes, preparações homeopáticas e agentes de controle biológico podem reduzir a intensidade de doenças (Diniz et al., 2006).

Ainda não há agentes de controle biológico e produtos naturais eficazes em reduzir a intensidade da ferrugem asiática em soja, porém vários trabalhos demonstram a eficiência de extratos vegetais, indutores de resistência e óleos essenciais no controle de doenças em diversas culturas.

Menezes et al. (2007) utilizaram o eliciador acibenzolar-S-methyl (ASM) contra *Puccinia hemerocallidis* Thum, agente etiológico da ferrugem em lírio-de-

são José e verificaram que o ASM proporcionou resistência sistêmica induzida do lírio ao fungo, mesmo decorridos até nove dias após a aplicação do indutor.

Em relação ao controle biológico, *Bacillus subtilis* vem apresentando resultados promissores no controle de doenças, como ferrugem causada por: *Uromyces phaseoli* (Backer et al., 1983; Backer et al., 1985; Bettiol, et al., 1994; Centurion, et al., 1991; Mizubuti et al., 1992). Bettiol et al. (1994) utilizaram extratos obtidos de caldo fermentado por *B. subtilis*, por meio da precipitação com sulfato de amônio ou ácido clorídrico, bem como a formulação (AM-62), na concentração de 1000ppm e observaram inibição total de urediniosporos de *Hemileia vastatrix*.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características eliciadoras (Schawan-Estrada et al., 2003).

A ação fungitóxica do óleo essencial de tomilho a 20% foi observada em trabalhos realizados em casa de vegetação com *Pseudoperonospora cubensis*, agente etiológico do míldio em pepino (*Cucumis sativus* L.). Os resultados foram significativamente diferentes aos da testemunha, mostrando a eficiência fungitóxica do óleo essencial de tomilho (Almada et al., 1998).

Uma espécie de planta largamente utilizada e estudada na terapêutica humana, e que apresenta resultados promissores também como produto fitossanitário natural, é o alho (*Allium sativum*). Segundo Moore e Atkins (1977) existem evidências para encorajar investigações sobre o uso do extrato de alho no combate às doenças fúngicas.

Verifica-se que há possibilidades de extrato ou óleo essencial de plantas com potencial para controlar doenças em plantas, alguns inclusive, já em uso,

como, por exemplo, o óleo de nim, que já vem sendo muito utilizado no controle de insetos pragas. Entretanto, grande parte dos trabalhos de pesquisa restringe-se aos testes *in vitro*, dificultando, portanto, seu uso na prática.

Baseado nessas informações, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar, em casa de vegetação e por meio da microscopia eletrônica de varredura, efeitos desses produtos no controle da *P. pachyrhizi*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado na cidade de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais.

2.2 Obtenção das sementes e condução dos experimentos

Utilizou-se no ensaio a cultivar MGBR-46 conhecida como Conquista, por ser susceptível à ferrugem. As sementes foram cedidas pelo Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Quatro sementes dessa cultivar foram semeadas em cada vaso de plástico com 3kg de mistura da terra, areia e esterco (2:1:2), deixando-se desenvolver duas plantas por vaso, num total de 40 vasos. Estes foram dispostos em 4 blocos (Figura 1), 10 vasos/bloco, sendo os tratamentos distribuídos inteiramente ao acaso. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e, ao 24º dia, realizou-se a primeira adubação com nitrato de amônia e, ao 30º dia, quando as plantas apresentavam-se no estágio V4 (dezembro), realizou-se a primeira aplicação dos produtos. As aplicações foram realizadas de 20 em 20 dias.



FIGURA 1: Vista geral do experimento em casa de vegetação.

2.3 Produtos utilizados

Os produtos utilizados neste experimento consistiram em óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela), *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora), *Azadirachta indica* (nim), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca), *Thymus vulgaris* (tomilho), extrato de bulbos de alho (*Allium sativum*), suspensão de *Bacillus subtilis* isolado AP3, acibenzolar-S-metil, conhecido pela marca comercial Bion[®], um fungicida piraclostrobina + epoxiconazole (marca comercial Opera[®]). Os produtos foram aplicados com pulverizador manual com capacidade para 500 mL. As aplicações sempre foram realizadas ao final da tarde, quando a temperatura ambiente se encontrava em torno de 25°C.

2.4 Obtenção e inoculação do patógeno

Após o sétimo dia da aplicação dos produtos, realizou-se uma pré-avaliação de incidência e procedeu-se à inoculação da suspensão de

urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* proveniente do campo experimental da UFLA. Para isso, preparou-se uma suspensão de urediniósporos (3×10^4 esporos por mL, contendo 0,1 mL de Tween 20% por 10 mL) obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação e com sinais do patógeno, a qual foi aplicada com pulverizador manual com capacidade de 500mL. Após o processo de inoculação, preparou-se câmara úmida, em que os vasos contendo as plantas foram envolvidos por sacos plásticos transparentes e pulverizados com água, os quais permaneceram por, aproximadamente, 12 horas para propiciar as condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Quinze dias após a inoculação do fungo (meados de janeiro), procedeu-se uma segunda pulverização dos óleos essenciais e extratos. Neste experimento realizaram-se duas avaliações.

Um novo experimento foi montado, em meados de fevereiro nas mesmas condições em que o primeiro. Neste não houve a necessidade de inocular, pois, devido à alta pressão de inóculo presente no ambiente, as plantas foram infectadas naturalmente. Este experimento foi conduzido até a senescência das plantas.

2.5 Preparo e obtenção dos produtos alternativos utilizados no ensaio

2.5.1 Obtenção e preparo dos óleos essenciais

Por se tratar de um produto cuja extração em laboratório demanda tempo, os óleos essenciais foram adquiridos em estabelecimentos especializados em produtos naturais. Os óleos utilizados com as respectivas concentrações foram: citronela a 500 μ L, eucalipto citriodora a 1000 μ L, nim a 1000 μ L, melaleuca a 600 μ L e tomilho a 300 μ L por litro de calda. A calda foi preparada nas seguintes condições: para cada óleo foi utilizado um béquer (constando identificação de cada tratamento), ao qual adicionaram três gotas de detergente neutro, segundo a metodologia adotada por Bastos (Comunicação pessoal, 2005). Em seguida, as

concentrações dos óleos foram adicionadas com micropipeta graduada em 1000 μ L. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de água e misturou-se a suspensão com um bastão de vidro. Logo após, completou-se o volume da calda com 990mL de água e transferiu-se para os pulverizadores manuais.

2.5.2 Preparo da suspensão do antagonista

Neste ensaio, utilizou-se *Bacillus subtilis* isolado AP3 cedida pela Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. Seguiu-se a metodologia utilizada por Mariano (2000). A suspensão de bactérias foi preparada da seguinte maneira: em placas de Petri depositou-se meio MB1 fundente à temperatura em torno de 45°C de maneira que cobrisse todo o fundo da placa. Após a solidificação do mesmo, 2 mL da suspensão dos isolados de *B. subtilis* foram transferidos para o meio e espalhados à alça de Drigalsky. Depois, as placas foram identificadas e vedadas com filme plástico e levadas a BOD com temperatura de 25°C por 24 horas. Depois que se cumpriu este período, preparou-se uma calda com o isolado AP3 de *B. subtilis*. As placas foram submetidas à lavagem com um pouco de água, formando assim uma calda. Esta calda era transferida para béquer contendo 1000mL de água. A concentração utilizada para pulverizar as plantas foi de 10⁸ ufc/mL ou $A_{(540)} = 0,52A$. Terminado esse procedimento, a calda foi transferida para um pulverizador e aplicada nas plantas.

2.5.3 Obtenção e preparo do indutor de resistência e fungicida

Ambos os produtos foram cedidos pelo Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e Clínica Fitopatológica da UFLA. O indutor empregado neste ensaio foi preparado conforme a recomendação do fabricante, ou seja, pesaram-se 0,4g do princípio ativo (acibenzolar-S-metyl) e diluiu-se em um litro de água.

O fungicida utilizado também foi aplicado na dosagem de 0,4g/L, entretanto, já na primeira aplicação, detectou-se leve fitotoxidez do produto.

Então, a dosagem na segunda aplicação foi reduzida para 0,2mL. Esses dois produtos foram utilizados no ensaio como controle positivo de indução de resistência e fungicida, respectivamente.

2.5.4 Obtenção e preparo do extrato de bulbos de alho

Tanto para a obtenção dos bulbos quanto para a extração do produto a metodologia utilizada está descrita no capítulo 2 deste trabalho. Entretanto, neste ensaio, foram adicionados à calda 20g de sabão de coco diluído, que atua como espalhante e adesivo, quando pulverizado sobre plantas.

2.6 Avaliações

As avaliações da severidade da doença foram realizadas quinzenalmente após a inoculação, sempre no período da manhã ou no final da tarde, em ambos os experimentos. As características avaliadas foram presença e número de lesões por cm² de área foliar analisado. Para isso foi avaliado um quadrado de um cm² das folhas centrais, do terço médio, de cada folíolo das plantas.

2.7 Preparo e observação de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na terceira avaliação, coletaram-se folhas para a preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV), cujo objetivo foi o de acompanhar os efeitos dos óleos sobre as estruturas do fungo na planta.

A preparação e a observação das amostras em MEV foram realizadas seguindo o procedimento de Alves (2004); aos 90 dias após inoculação, coletaram-se folíolos do terço médio das plantas. Os mesmos foram cortados em pedaços de 0,5 X 0,5 cm, os quais foram imersos em solução fixativa (Karnovsky), pH 7,2, por 24 horas. Após esse período de fixação, o material foi imerso em tampão cacodilato por 3 vezes de 10 minutos em cada imersão e, após

esse processo, foi transferido para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e, subseqüentemente, desidratado em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% uma vez cada e 100% por três vezes) e, depois, levado para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em MEV Leo Evo 40XVP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Efeito das doses de óleos essenciais sobre a severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja

Levando em consideração a avaliação da severidade da doença com base na presença de lesões em folíolos inoculados, foi possível constatar que os tratamentos diferiram da testemunha em ambos os experimentos (Tabelas 1 e 2) e os melhores tratamentos, comparados ao fungicida apresentaram potencial para o controle da ferrugem asiática sob condições controladas. Entretanto, no primeiro experimento, constatou-se que o tratamento com o produto comercial Bion[®] diferiu da testemunha, enquanto que no segundo experimento, ele não apresentou potencial para induzir resistência à ferrugem asiática.

Como os dados referem-se à contagem, os mesmos tiveram que ser transformados. Utilizou-se, para a transformação, $\sqrt{X + 1}$, que reduziu consideravelmente o coeficiente de variação, indicando que os dados experimentais foram ajustados de acordo com as exigências da análise de variância.

TABELA 1: Efeito de óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e extrato de *Bacillus subtilis* sobre o desenvolvimento de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja mantidas em casa de vegetação (1º experimento).

Tratamentos	Médias
Fungicida	0,00 a
Nim	0,00 a
Citronela	0,25 a
Tomilho	0,25 a
Alho	0,50 a
Bacillus	0,75 a
Melaleuca	0,75 a
Bion	2,00 a
Citriodora	2,25 a
Testemunha	6,75 b

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a de 5% significância.

TABELA 2: Efeito de óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e extrato de *Bacillus subtilis* sobre o desenvolvimento de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja mantidas em casa de vegetação (2º experimento)

Tratamentos	Médias
Fungicida	7,00 a
Alho	9,75 a
Nim	18,75 a
Bacillus	19,00 a
Citronela	20,00 a
Melaleuca	20,75 a
Tomilho	22,00 a
Citriodora	28,50 a
Bion	39,50 a
Testemunha	68,50 b

Médias com a mesma letra na coluna, resultados do teste não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% significância.

TABELA 3: Redução do número de lesões em relação à testemunha (%)

Tratamentos	Redução do número de lesões em relação à testemunha (%)	
	Primeiro experimento	Segundo experimento
Fungicida	100,0	89,8
Alho	92,6	85,8
Nim	100,0	72,6
Bacillus	88,9	72,3
Citronela	96,3	70,8
Melaleuca	88,9	69,7
Tomilho	96,3	67,9
Citriodora	66,7	58,4
Bion	70,4	42,3

Efeitos tóxicos sobre o patógeno foram observados por Silva et al. (2006) em teste *in vivo*, quando utilizaram óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, extrato de alho e Ecolife®. Apesar dos tratamentos não terem apresentado diferença estatística significativa, estes reduziram, respectivamente em 45,3%, 38,2%, 13,7% e 36,2%, a incidência de *Fusarium semitectum* em inflorescência de *Tapeinochilus ananassae*. Estes resultados permitem afirmar que tanto os óleos quanto o extrato de alho apresentam potencial fungitóxico para controle de fitopatógenos.

Em relação ao efeito tóxico dos tratamentos com óleos essenciais do extrato de alho e a suspensão de *B. subtilis*, observou-se que nenhum tratamento apresentou efeito fitotóxico ao hospedeiro.

Carneiro et al. (2006) também verificaram a eficiência do óleo e do extrato de folhas de nim (*Azadirachta indica*) contra o oídio (*Erysiphe polygoni*)

do feijoeiro em casa de vegetação esses autores constataram que, após a segunda pulverização, o tratamento com o óleo de nim a 0,25% e 0,5% apresentou redução de 79% na severidade da doença, semelhante ao fungicida, no controle do oídio. O extrato de folhas não controlou o oídio, nas duas concentrações avaliadas.

Em relação ao tratamento com ASM, verificou-se que o produto não favoreceu a indução de resistência em plantas de soja contra a ferrugem asiática. Entretanto, não se sabe ao certo por que no primeiro experimento, ele apresentou efeito, enquanto que, no segundo experimento, as plantas não diferiram estatisticamente das plantas controle. Medice et al. (2006), em trabalho realizado em campo com este mesmo produto, não observaram indução de resistência em plantas de soja infectada com *P. pachyrhizi* e concluíram que ele não apresenta potencial para induzir resistência em plantas de soja contra a ferrugem asiática.

Variação no efeito desse produto é comum, como observado por Töfoli & Domingues (2005), em plantas de tomate, para induzir resistência contra a pinta-preta, causada por *Alternaria solani*, principal doença da cultura. Os mesmos autores verificaram que o uso isolado de ASM reduziu significativamente a severidade da pinta-preta em folíolos e a porcentagem de área foliar afetada pela doença, todavia não proporcionou aumentos significativos no número de frutos sadios, massa fresca e produção comercial de frutos. Chegaram à conclusão de que o ASM apresentou apenas ação parcial sobre a doença.

Em relação à suspensão de *B. subtilis*, foi observado efeito positivo no controle da ferrugem asiática. Trabalhos realizados anteriormente comprovaram o efeito deste extrato no controle de doenças de plantas. Baker et al. (1985) verificaram que a severidade da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi reduzida em, pelo menos, 75%, em 1982 e 1983, com três aplicações por semana de *B. subtilis*, cujo nível de controle foi comparável ao obtido com o fungicida mancozeb, aplicado uma vez por semana. Kupper et al. (2003), estudando o efeito

de sete isolados de *B. subtilis* no controle da queda prematura de frutos cítricos (*Colletotrichum acucatum*), em condições naturais, verificaram que o isolado ACB-69 diferiu da testemunha e de vários outros isolados, porém equiparou-se estatisticamente ao tratamento com benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos.

Verifica-se que são poucos os trabalhos referentes ao controle alternativo de doenças, por isso, estudos mais detalhados devem ser realizados, no que diz respeito, principalmente, às formulações mais adequadas, dosagem, período e número de aplicações e ações desses produtos.

3.2 Vigor das plantas

Por meio da diagnose visual, foi possível observar que as plantas tratadas apresentaram-se mais desenvolvidas e viçosas (Figura 1), ou seja, a severidade da doença foi menor quando foram comparadas visualmente com a testemunha.

Tal fato leva à hipótese de que os óleos essenciais e extratos utilizados neste trabalho podem apresentar parcial indução de resistência ou, até mesmo, substâncias presentes nestes produtos possam formar algum tipo de barreira que interfira na penetração e no desenvolvimento do patógeno, afetando, assim, a severidade da doença, uma vez que a ferrugem asiática é extremamente agressiva.

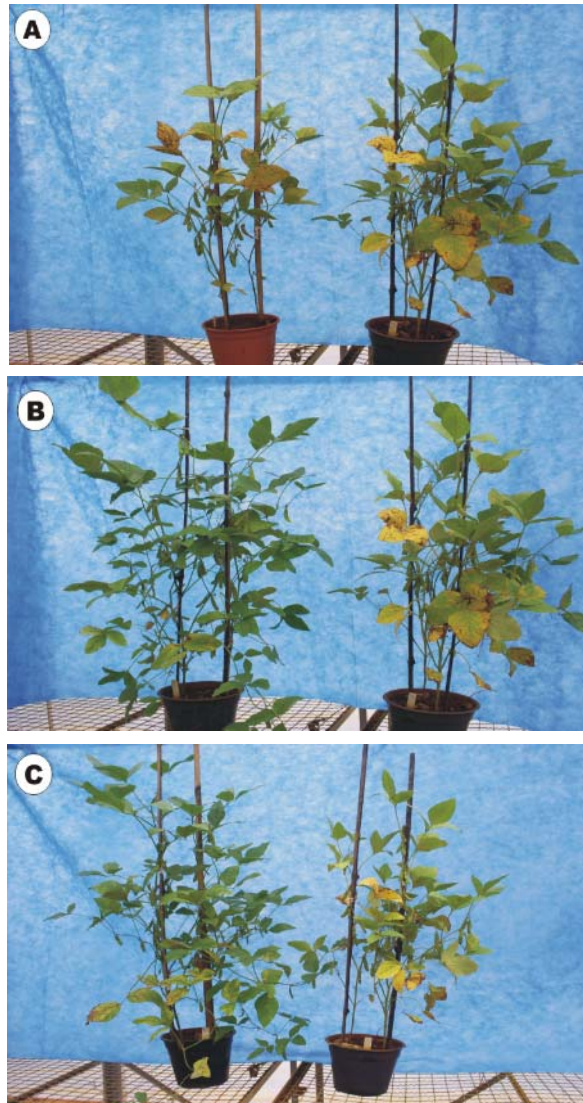


FIGURA 1: (A) Plantas de soja da cultivar MG/BR 46 (Conquista) infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*. À esquerda tratamento com acibenzolar-S-methyl; (B) plantas que receberam a aplicação de fungicida; (C) plantas que receberam o tratamento com extrato de bulbos de alho. À direita de todos os tratamentos, planta que recebeu tratamento com água.

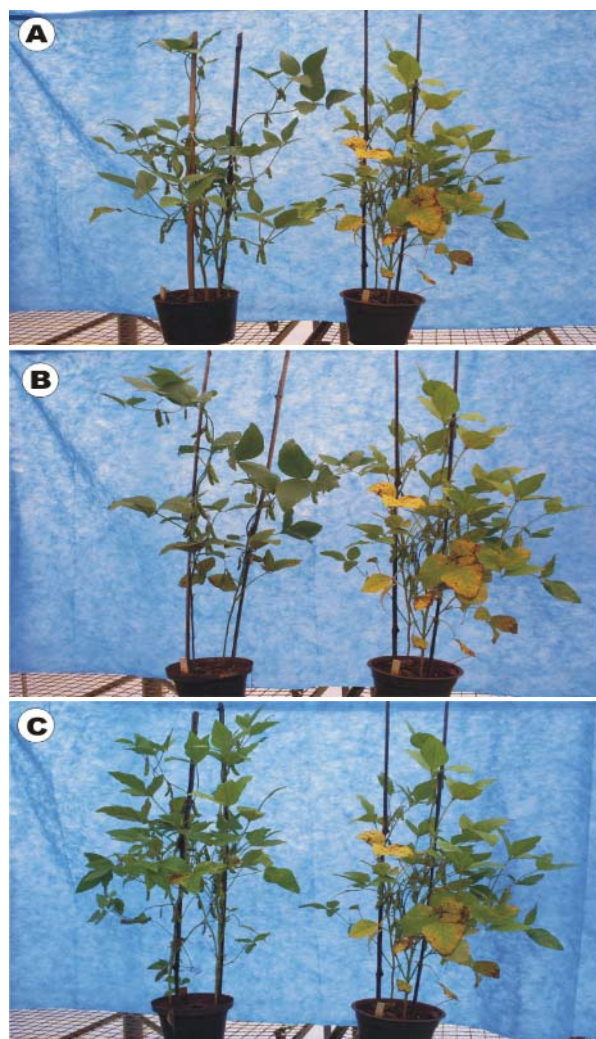


FIGURA 2: (A) Plantas que receberam tratamento com óleo essencial de citronela; (B) plantas que receberam tratamento com suspensão de *Bacillus subtilis*; (C) plantas que receberam tratamento com óleo essencial de eucalipto citriodora. À direita de todos os tratamentos, planta que recebeu tratamento com água.

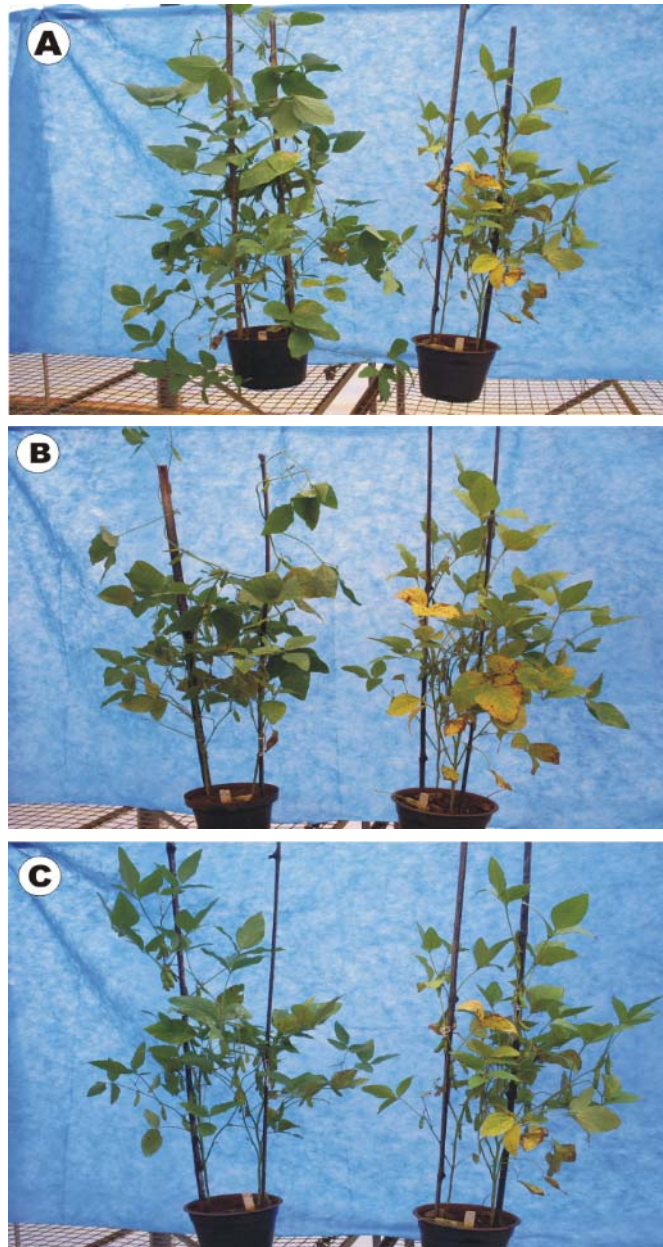


FIGURA 3: (A, B e C) plantas que receberam tratamento com óleo essencial de (A) melaleuca, (B) Nim e (C) tomilho, respectivamente. À direita de todos os tratamentos, planta que recebeu tratamento com água.

3.3 Observações das amostras de folhas de soja submetidas aos tratamentos com produtos alternativos por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas observações realizadas em MEV pode-se constatar que, nas folhas provenientes das plantas com tratamento com acibenzolar-S-methyl e água, os urediniósporos germinaram normalmente (Figura 4A e 4B), enquanto que os tratamentos com óleos essenciais tiveram efeito direto sobre o patógeno, ou seja, ocasionou murcha destes. Entretanto, verificou-se que o tratamento com óleo essencial de citronela (Figura 4D) não ocasionou murchas de urediniósporos, porém, observou-se, nas folhas dessas plantas, diminuição na esporulação e ausência de germinação quando comparados à testemunha (Figura 4B).

Pereira (2005) já havia verificado que o óleo essencial de tomilho reduziu a germinação e o crescimento de conídios de *Cercospora coffeicola*, além de ocorrer extravasamento nas hifas. Medice et al. (2007) verificaram, por meio da microscopia eletrônica de varredura, que o óleo essencial de tomilho teve efeito fungicida direto sobre os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, ocasionando murcha dos mesmos.

Entretanto, há certa carência de trabalhos realizados no controle de fitodoenças *in vivo* utilizando óleos essenciais e aplicando a microscopia eletrônica para verificar efeitos desses produtos sobre patógenos.

No caso da *P. pachyrhizi*, este é um dos poucos trabalhos realizados com controle alternativo contra este patógeno. Entretanto, outros deverão ser iniciados para se estabelecer as melhores doses, quais os produtos economicamente viáveis e confirmar quais os mecanismos de atuação dos mesmos no controle do patógeno.

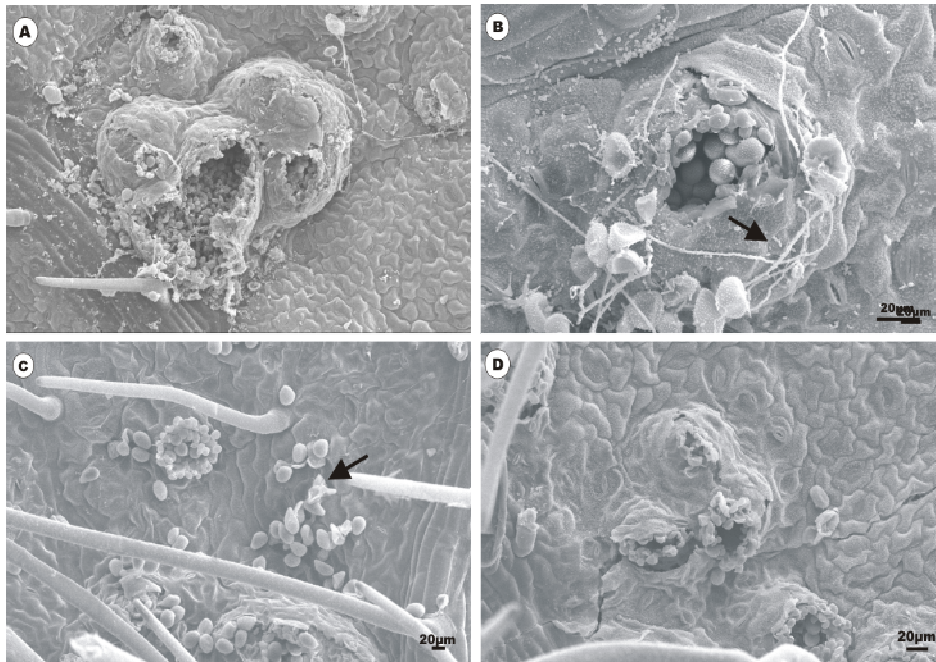


FIGURA 3: Eletromicrografias de varreduras de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* mantidas em casa de vegetação e submetidas à aplicação de diversos óleos essenciais. (A, B, C e D) soros urediniais em plantas que receberam a aplicação de acibenzolar-S-methyl, água e fungicida, respectivamente; (D) soros urediniais em plantas que receberam a aplicação de óleo essencial de citronela.

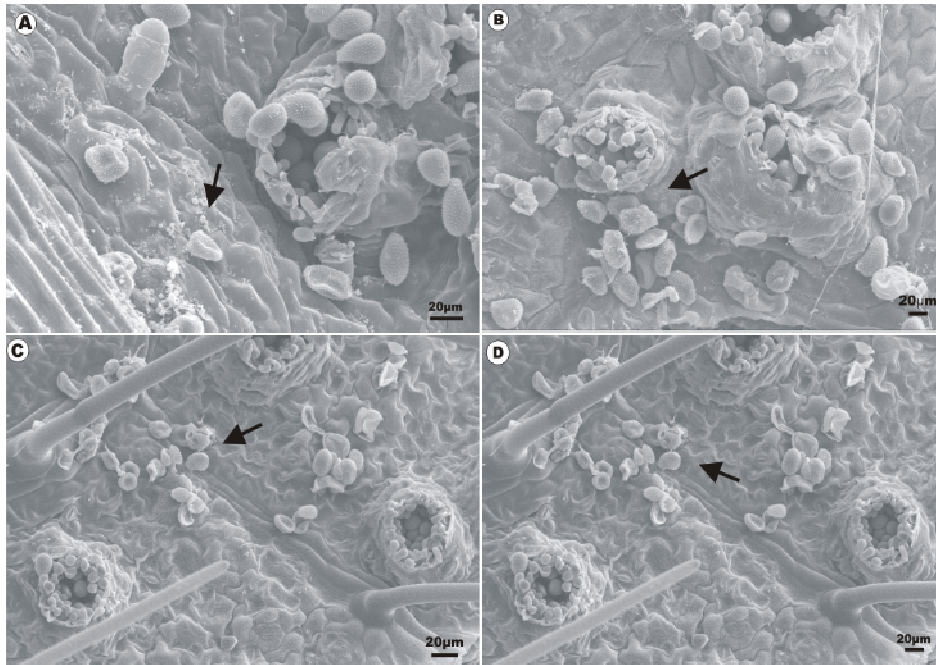


FIGURA 5: Eletromicrografias de varreduras de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* mantidas em casa de vegetação e submetidas à aplicação de óleo essencial (A) eucalipto citriodora, (B) melaleuca, (C) nim e (D) tomilho.

Verificou-se que óleos essenciais de eucalipto citriodora, melaleuca, nim e tomilho ocasionaram a murcha dos urediniósporos e ausência de emissão do tubo germinativo (setas), quando comparado ao tratamento controle (Figura 4B)

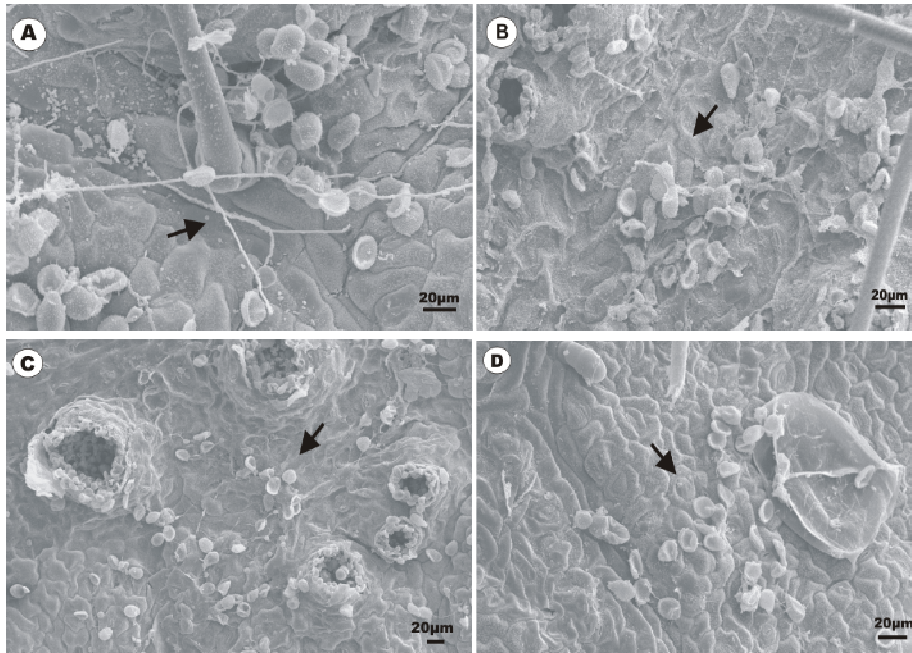


FIGURA 6: Eletromicrografias de varreduras de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* (A e B) Soros urediniais em plantas que receberam tratamento com água e fungicida; (C e D) soros urediniais em plantas que receberam a aplicação de extrato de bulbos de alho e suspensão de *Bacillus subtilis*.

Verifica-se que, em ambos os tratamentos, o extrato de alho (Figura 6C) e a suspensão de *B. subtilis* (Figura 6D) apresentaram efeito sobre os urediniósporos, ocasionando murcha dos mesmos quando comparado ao tratamento com fungicida (Figura 6B). Por meio das eletromicrografias observou-se, ainda, que ocorreu ausência de germinação dos urediniósporos que receberam os tratamentos quando comparados ao tratamento controle (Figura 6A).

4 CONCLUSÕES

Tanto o extrato de bulbos de alho como os óleos essenciais apresentaram potencial para o controle da ferrugem asiática, proporcionando também, para as plantas, maior vigor.

A suspensão de *Bacillus subtilis* apresentou potencial para o controle da *Phakopsora pachyrhizi*, quando aplicado sob condições controladas.

Verificou-se, por meio da microscopia eletrônica de varredura, que todos os tratamentos com exceção do acibenzolar-S-methyl apresentam inibição de germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADA, C. B. J.; LIMA, C. Z. R. L.Z.; POSSAMAI, C. J. Controle alternativo do Míldio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk e Curt) em pepino (*Cucumis sativus* L). **Fitopatologia Brasileira**, v. 23 p. 294, 1998.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE, 2004. 43 p. Apostila.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; THOMAS, C. A.; SASSER, M.; MACFALL, J. S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n. 8, p. 1148-1152, 1983.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 9, p. 770-772, 1985.
- BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 2, p. 119-122, 1994.
- CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E. C.; GOMES, J. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, 2006.
- CENTURION, M. A. P. C. Controle biológico de ferrugem (*Uromyces phaseolorum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.365-382.
- DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A. ; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 171-179, 2006.
- KUPPER, K. C. et al. Agentes de controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28. n. 3, p. 251-257, 2003.

MEDICE, R ; ALVES, E. ; MAGNO JUNIOR, R. G. ; ASSIS, R. T. ; LEITE LOPES, E. A. G. . Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG: v. 31, n.1 p. 83-90, 2007.

MEDICE, R.; ALVES, E.; CARVALHO, E. A ; MAGNO JUNIOR, R. G.; NAVES, R. P.; LEITE, E. A. G ; ANDRADE, E. A. Acibenzolar-S-methyl como indutor de resistência contra *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática em soja, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31.p. 214S, 2006.(Resumo)

MENEZES, S. P.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, A. C. Indução de resistência sistêmica em lírio –de-são-josé à *Puccinia hemerocallidis* sob tratamento de diferentes concentrações e períodos de aplicação de Acibenzolar-S-Metyl. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO E RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS, 3, 2007. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p.311.

MIZUBUTI, E. S. G. **Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis***. 1992. 87 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MOORE, G. S.; ATKINS, R. D. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. **Mycologia**, New York, v. 69, n. 2, p. 341-348, 1977.

SILVA, J. C.; FURTADO, D. C. de M.; AMORIM, E. P. da R.; GALVÃO, A. L. B.; ALMEIDA, G. T. Uso de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de murcha em *Tapeinochillus anassae* causada por *Fusarium semitectum*. Salvador, **Fitopatologia Brasileira**, 2006 (Resumo).

TÖFOLI, G. J.; DOMINGUES, J. R. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 481-487, 2005.

CAPÍTULO 4

**ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum* L.) E
SUSPENSÃO DE *Bacillus subtilis* NO CONTROLE DA FERRUGEM
ASIÁTICA DA SOJA EM CAMPO.**

RESUMO

MEDICE, Regiane. Óleos essenciais, extrato de alho (*Allium sativum* L) e suspensão de *Bacillus subtilis* no controle da ferrugem asiática da soja em campo. In: _____ **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizida*) soja** 2007. Cap 4, p 65-79. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG*.

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o comportamento de diferentes óleos essenciais, extrato de alho e suspensão de *Bacillus subtilis*, no controle da severidade da ferrugem asiática da soja em campo. Testaram-se os óleos essenciais de eucalipto citriodora 0,1%, citronela 0,5%, melaleuca 0,6%, nim 0,1%, tomilho 0,3%, extrato de alho 20% e suspensão de *B. subtilis* na concentração de 10^8 ufc, testemunha e um controle com o fungicida Opera®. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com três repetições e nove tratamentos. Utilizou-se a cultivar MG/BR 46 'Conquista', suscetível à ferrugem da soja, cujas sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* veiculado em material turfoso, na concentração de 4×10^9 células por grama, na proporção de 125 g de inoculante por 50 kg de semente. Foram realizadas três aplicações, nos estádios V₅, R₂ e R₄, sempre no final do dia, com um pulverizador costal pressurizado com CO₂, sob pressão constante de 60 lb.pol² até o ponto de escorrimento. As parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 5,0m espaçadas, de 0,50m, usando como área útil as duas linhas centrais, com eliminação de 0,50m em cada extremidade a título de bordadura, perfazendo 4m² de área útil. Foram realizadas três avaliações da severidade da ferrugem. A severidade foi quantificada pela porcentagem de tecido lesionado, de acordo com escala diagramática, em folíolos centrais de trifólios do terço médio das plantas. Verificou-se que os tratamentos diferiram significativamente (P<0,05) quanto à severidade, apresentou comportamento diferente nas três épocas avaliadas. Os melhores tratamentos foram: fungicida, nim, melaleuca, suspensão de *B. subtilis*, alho, eucalipto citriodora e citronela, entretanto, o óleo essencial de tomilho não diferiu da testemunha. Os produtos avaliados, com exceção do óleo de tomilho, apresentaram potencial para o manejo da ferrugem asiática da soja em campo.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves - UFLA (Professor Orientador); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

MEDICE, Regiane. Use of essential oils, garlic extract (*Allium sativum* L) and *Bacillus subtilis* suspension to control soybean rust in the field conditions. In: **Alternative products for the management of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizida*)** 2007. Cap 4, p 65-79. Master Dissertation (Master Degree in Plant Pathology) - Lavras Federal University, Lavras-MG*.

The aim of this research work was to observe the behavior of different essential oils, garlic extract and a *Bacillus subtilis* suspension, to control the severity of soybean rust in the field cultivation. Treatments consisted of *Eucalyptus citriodora* 0,1%, *Cymbopogon nardus* 0,5%, *Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* 0,06%, *Thymus vulgaris* 0,3%, garlic bulb extract 20% (*Allium sativum*) and a *B. subtilis* suspension at a concentration of 10^8 cfu, absolute control and commercial fungicide Opera™. The experimental design used was in complete randomized blocks with three repetitions and nine treatments. The cultivar used was MG/BR 46 'Conquista', which is susceptible to soybean rust. The seeds were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* which was mixed with turf in a concentration of 4×10^9 cells per gram, in a proportion of 125 g of inoculants per 50 kg of seeds. Three applications were conducted, in the soybean development stages of V₅, R₂ e R₄, always at the end of the day. In order to pulverize the treatments, the equipment used was a CO₂ pressure atomizer, with a constant pressure of 60 lb.pol² until reaching the draining point. The experimental parcels consisted of 5,0m spaced by 0,50m, counting as the valid areas, only the two central lines, eliminating 0,5 m from each extreme, summarizing 4m² of valid area. A total of three severity evaluations for soybean rust were conducted. Severity was quantified by the percentage of lesioned tissue, according to the diagrammatic scale, in the central leaves of the trefoil at the medium third of the plants. It was observed that the treatments differed significantly (P<0,05) as to the severity, having presented different behavior in the 3 distinct times of evaluation. The superior treatments were: the commercial fungicide, *A. indica*, *M. alternifolia*, *B. subtilis* suspension, garlic extract, *C. citriodora* and *C. nardus*. On the other hand, *T. vulgaris* essential oil did not differ from the control. The products tested, except for *T. vulgaris* essential oil, demonstrated a potential to be used in the management of soybean rust in the field conditions.

* Supervising Committee: Eduardo Alves - UFLA (Supervisor); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Supervisor).

1 INTRODUÇÃO

A redução da produção em uma lavoura pode ser ocasionada por diversos fatores. A ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides pode ser uma das principais causas, podendo ocasionar prejuízos ao produtor. Para a cultura da soja, um dos maiores problemas enfrentados são as doenças ocasionadas por fungos e, entres todas, destaca-se a ferrugem asiática, causada por *Phakospora pachyrhizi*, seu agente causal. A ferrugem asiática é, uma doença altamente destrutiva e agressiva em todos os países onde é detectada.

Por se tratar de uma doença severa, o uso indiscriminado de agrotóxicos no seu controle tem sido cada vez mais freqüente na cultura da soja.

A adoção contínua do controle químico pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados (Ghini e Kimati, 2000), o que poderia acontecer com a *P. pachyrhizi*, uma vez que não existem produtos diversificados para seu controle. Além da resistência do patógeno ao fungicida, o uso abusivo deste pode ocasionar contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação de homens e animais, ressurgimento de algumas pragas e outras, antes consideradas secundárias, podem tornar-se importantes (Burg e Mayer, 1998). Tais efeitos têm estimulado a busca por formas alternativas de controle de doenças de plantas (Nakasone et al., 1999).

Entre essas alternativas, produtos à base de plantas medicinais, tais como óleos essenciais e extratos de plantas, têm apresentado resultado no controle doenças em plantas. Stangarlin et al. (1999) e Fiori et al. (2000) afirmam que isso é possível devido à grande atividade antimicrobiana direta e indireta que esses produtos extraídos das plantas podem apresentar.

Medice et al. (2007) estudaram o efeito de diferentes óleos essenciais em plantas de soja mantidas em casa de vegetação e infectadas por *P. pachyrhizi* e

observaram que os óleos utilizados, principalmente o de tomilho (*Thymus vulgaris*), reduziram a severidade da doença, em média, de 34,59% a 60,75%, apresentando, portanto, potencial para o controle desse patógeno.

Trabalho realizado por Pereira (2006) com extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho mostrou resultados promissores no controle da cercosporiose do cafeeiro (*Cercospora coffeicola*), reduzindo a incidência da doença quando aplicado sete dias antes da inoculação do patógeno.

Além do uso de óleos essenciais e extrato de plantas, muitos estudos têm sido feitos com a utilização de bactérias antagônicas a determinados fitopatógenos, para o controle de muitas doenças foliares. *Bacillus subtilis*, uma bactéria encontrada no filoplano, vem merecendo estudos para controle de patógenos desse ambiente (Kupper, 2000). Ferreira et al. (1991) verificaram que um isolado de *B. subtilis*, obtido do tronco de videira, inibiu o crescimento *in vitro* de *Eutypa lata*, agente causal da morte do ponteiro da videira. De acordo com os autores, *B. subtilis* inibiu em 91,4% e 100% o crescimento micelial e a germinação de ascósporos do fitopatógeno, respectivamente. Em condições de campo, verificaram que, pulverizando-se a suspensão da bactéria sobre os ferimentos de poda, antes da inoculação com ascósporos de *E. lata*, a infecção foi reduzida significativamente, quando comparada à testemunha sem aplicação do agente de controle biológico.

Com bases nessas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar em campo o efeito dos produtos alternativos no controle da ferrugem asiática da soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento e condução do ensaio

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, situada a 918m de altitude, 21°14' de latitude Sul e 45°00' longitude oeste. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com três repetições e nove tratamentos, conforme Tabela 1.

TABELA 1: Óleos essenciais, extrato de alho, suspensão de *Bacillus subtilis* no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*).

Tratamentos	Estádios de aplicação	Dosagens
Óleo essencial de citronela	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	0,5 mL.L ⁻¹
Óleo essencial de eucalipto citriodora	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	1 mL.L ⁻¹
Óleo essencial de melaleuca	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	0,6 mL.L ⁻¹
Óleo de nim	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	1 mL.L ⁻¹
Óleo essencial de tomilho	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	0,3 mL.L ⁻¹ L
Extrato de bulbo de alho	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	200 mL.L ⁻¹
Suspensão de <i>Bacillus subtilis</i>	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	10 ⁸ ufc.L ⁻¹
Piraclostrobina e epoxiconazol	V ₅ ; R ₂ ; R ₄	66,5+25g i.a.L ⁻¹
Testemunha	-	-

Estádios fenológicos de acordo com escala de Fehr & Cavines (1977).

O preparo do solo, classificado como Latossolo Vermelho Distroférico típico (LVdf), constituiu-se de uma aração seguida de duas gradagens. A saturação de bases foi elevada a 60%, após prática de calagem e a adubação química realizada de acordo com a análise do solo, aplicando-se 120 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 60 kg.ha⁻¹ de K₂O distribuídos e incorporados aos sulcos de plantio. A semeadura foi realizada no dia 7 de março de 2007, utilizando-se a cultivar MG/BR 46 Conquista, suscetível à ferrugem asiática da soja, cujas sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* veiculado em material turfoso, na concentração de 4 x 10⁹ células por grama, na proporção de 125 g de inoculante por 50 kg de semente. Os desbastes foram realizados quinze dias após a emergência das plântulas, mantendo-se a população de 15 plantas por metro. Demais tratamentos culturais exigidos pela cultura, como controle de plantas daninhas e de pragas, foram realizados uniformemente em todas as parcelas experimentais.

As aplicações foram realizadas sempre no final do dia, em horários de temperaturas ascendentes, com um pulverizador costal pressurizado com CO₂, sob pressão constante de 60 lb.pol² até o ponto de escorrimento. As parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 5,0m espaçadas de 0,50m, usando como área útil as duas linhas centrais, com eliminação de 0,50m em cada extremidade, a título de bordadura, perfazendo 4 m² de área útil.

2.2 Avaliação da doença

A avaliação da severidade da ferrugem iniciou-se com o aparecimento das primeiras lesões (estádio R1), tendo sido realizadas três avaliações. A severidade foi quantificada pela porcentagem de tecido lesionado, de acordo com escala de Godoy (2006), em folíolos centrais de trifólios do terço médio das plantas. Para isso, os folíolos de seis plantas escolhidas aleatoriamente por parcela foram

marcados no experimento. Após três avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença em cada tratamento (Shaner & Finney, 1977).

2.3 Plotagem da curva de progresso

Após três avaliações, a curva de progresso da doença foi obtida plotando-se a proporção de doenças no eixo y e os tratamentos no eixo x, para a representação da epidemia.

2.4 Análise estatística

A análise de variância foi realizada no programa Sisvar[®] - versão 4,6 (Build 6.1). Quando a variável foi significativa no teste F, as médias entre os tratamentos foram comparadas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Para a análise de variância da variável severidade, foi considerado o delineamento em blocos casualizados no esquema de parcela subdividida no tempo, uma vez que foram feitas três avaliações.

2.5 Dados climáticos

As variações médias diárias de precipitação (mm), temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%), no período de março/2007 a maio/2007, foram registradas em estação climatológica da Universidade Federal de Lavras, localizada nas proximidades do experimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Severidade

A severidade foi avaliada com base na escala diagramática. Pela análise de variância, pode-se verificar que os tratamentos diferiram significativamente ($P < 0,05$) quanto à severidade, assim como a severidade tem comportamento diferente nas três épocas avaliadas (Tabela 2). A interação tratamentos x época também foi significativa ($p < 0,05$), o que leva a concluir que há uma relação de dependência entre esses fatores, ou seja, os tratamentos têm comportamento diferenciado quanto à severidade nas diferentes épocas de avaliação e vice-versa.

TABELA 2: Severidade da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), em função da aplicação de óleos essenciais e extratos em três épocas. Dados avaliados com base na escala diagramática.

Tratamentos	Épocas de avaliação		
	1	2	3
Alho	0,31 a A	2,06 a A	13,44 b B
Bacillus	0,35 a A	2,50 a A	10,69 a B
Citronela	0,23 a A	3,62 a A	14,42 b B
Eucalipto	0,35 a A	4,31 a A	12,63 a B
Fungicida	0,46 a A	1,57 a A	0,64 a A
Melaleuca	0,32 a A	2,37 a A	8,33 a B
Nim	0,15 a A	1,53 a A	9,71 a B
Testemunha	0,53 a A	8,66 a A	34,00 b C
Tomilho	0,54 a A	2,28 a A	28,83 b C

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente ($P > 0,05$), pelo teste de Scott Knott.

Pelos dados da tabela 2, pode-se observar que, na 1ª e 2ª época de avaliação, nenhum tratamento diferenciou entre si, provavelmente devido à baixa incidência da doença. Porém, na terceira aplicação, o tratamento com melhores efeitos no controle da ferrugem da soja fungicida, extrato de bulbos de alho, suspensão de *Bacillus subtilis*, óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, melaleuca e nim, não diferenciando estatisticamente entre si. O tratamento com óleo essencial de tomilho não diferenciou estatisticamente da testemunha, apresentando as maiores percentagens de tecidos lesionados.

Para a área abaixo da curva de progresso da porcentagem de tecido lesionado (AACPS), com exceção do tratamento com óleo essencial de tomilho, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha. O tratamento com óleo essencial de tomilho diferiu estatisticamente dos outros tratamentos e da testemunha.

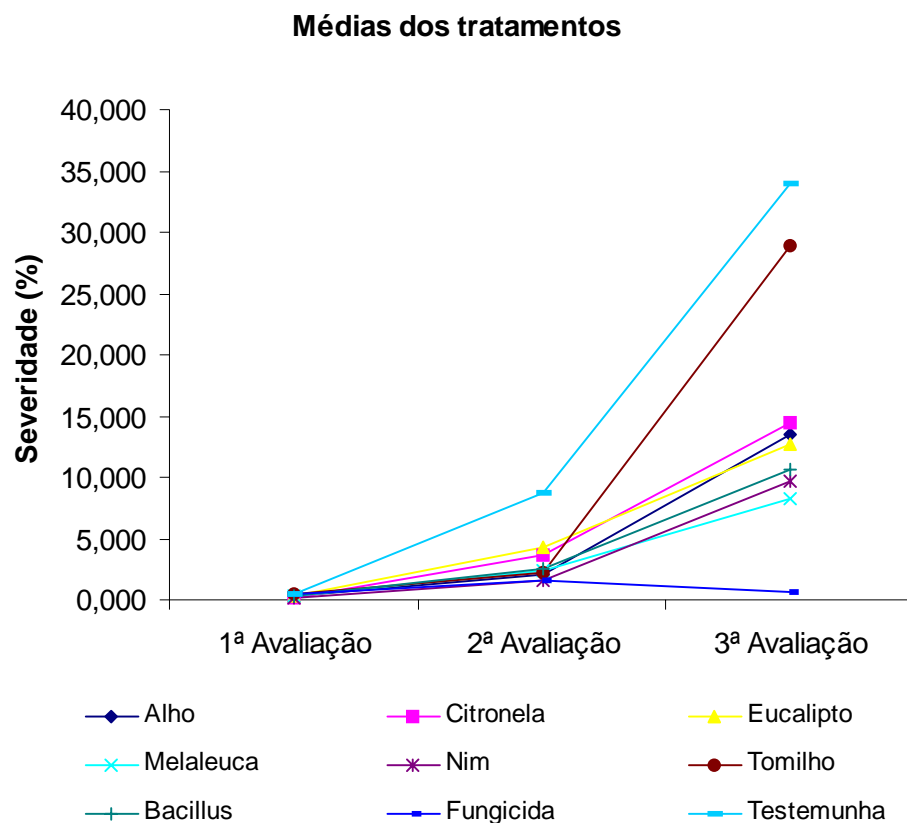


FIGURA 3: Área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem da soja, em função dos tratamentos.

De acordo com os resultados apresentados no gráfico da figura 3, quando se pulverizou com óleo essencial de tomilho, pôde-se observar diferença na 3ª avaliação. Provavelmente, algum fator pode ter influenciado na ação desse produto, como temperatura ou clima, ou, até mesmo, esse óleo pode ter sofrido volatilização quando aplicado em campo. Isso contraria os resultados obtidos em casa de vegetação, segundo os quais esse óleo essencial foi eficaz no controle da

doença, sob condições controladas. Medice et al. (2007) verificaram a ação de diferentes óleos essenciais no controle da ferrugem asiática em casa de vegetação e observaram que os óleos testados sob condições controladas, inclusive o óleo essencial de tomilho, apresentaram potencial para o controle da doença. Comparando-se esses resultados, pode-se chegar à hipótese de que algum fator estaria influenciando a ação do produto quando aplicado em campo ou, então, esses óleos essenciais apresentariam efeito em longo prazo, uma vez que esses tratamentos começaram a se diferenciar a partir da 2ª época de aplicação.

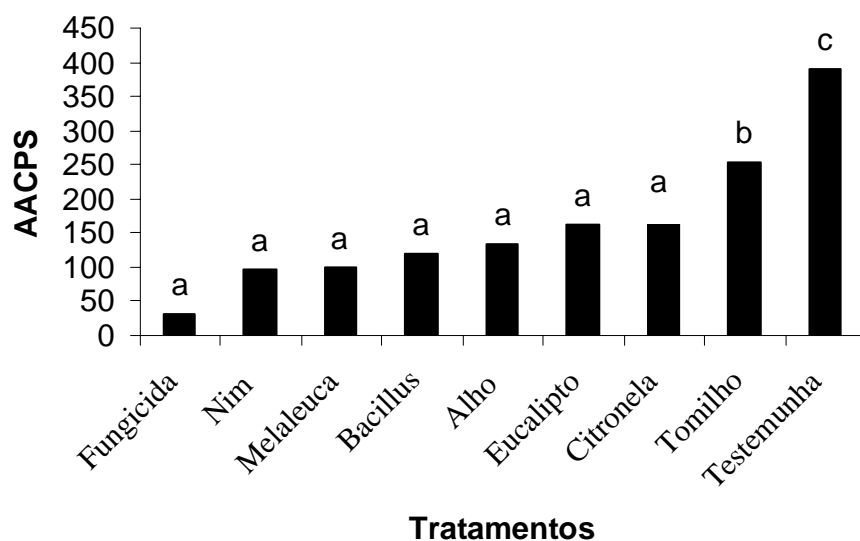


FIGURA 4: Área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem da soja, durante o período de avaliação.

Com base nesses resultados, verificou-se que os melhores tratamentos foram: fungicida, nim, melaleuca, suspensão de *Bacillus subtilis*, extrato de alho,

eucalipto citriodora e citronela. Entretanto, mais uma vez, o tratamento com óleo essencial de tomilho diferiu de todos os tratamentos e da testemunha, levando à hipótese de que este, quando aplicado em campo, pode ser volátil.

Não existem trabalhos na literatura com a utilização de óleos essenciais aplicados em campo para o controle da ferrugem asiática. Assim, este estudo pode ser considerado como um dos poucos que mostraram tal efeito e o primeiro no patossistema *P. pachyrhizi* X soja.

4 CONCLUSÕES

Os tratamentos com óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, melaleuca e nim tiveram efeito no controle da severidade da ferrugem asiática em campo.

O tratamento com extrato de bulbos de alho e suspensão de *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da ferrugem da soja.

O tratamento com óleo essencial de tomilho não apresentou ação no controle da severidade da ferrugem asiática em campo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURG, I. C.; MAYER, P. H. Introdução. In: _____. **Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. Francisco Beltrão: Grafit, 1998. p.13.
- FEHR, W. R.; CAVINES, C. E. **Stage of soybean development**. Ames Iowa: Ames Iowa State University, 1977. 11p.
- FERREIRA, J. H. S.; MATTHEE, F. N.; THOMAS, A. C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 283-287, 1991.
- FIORI, A. C. G. et al. Atividade de lecitinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 373, 2000.
- GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000.
- GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 63-68, 2006.
- MEDICE, R.; ALVES, E.; MAGNO JUNIOR, R. G.; ASSIS, R.T.; LEITE LOPES, E. A. G. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n.1, p. 83-90, 2007.
- KUPPER, K.C. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos**. 2000. 128p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal-SP.
- NAKASONE, A. K. et al. Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 4, p. 331, 1999.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 8, p. 1183-1186, 1977.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais: biotecnologia. **Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-24, 1999.

PEREIRA, R. B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & cooke em cafeeiro**. 2006. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO 5

**ALTERAÇÕES PROVOCADAS POR ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATO
DE BULBO DE ALHO E SUSPENSÃO DE *Bacillus subtilis* SOBRE OS
UREDINIÓSPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi***

RESUMO

MEDICE, Regiane. Alterações provocadas por óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e suspensão de *Bacillus subtilis* sobre os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: _____ **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja**, 2007. Cap 5, p.81-94. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG* .

Neste trabalho, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para acompanhar os efeitos de diversos produtos sobre desenvolvimento da *Phakopsora pachyrhizi*. Folíolos de plantas de soja infectados com o patógeno foram coletados e acondicionados em bandejas plásticas forradas com papel de filtro umedecido com água destilada. Após esse procedimento com pulverizadores manuais, foram aplicados nove tratamentos: *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) 0,1%, *Cymbopogon nardus* (citronela) 0,05%, *Azadirachta indica* (nim) 0,1%, *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) 0,06%, *Thymus vulgaris* (tomilho) e extrato de bulbos de alho 20% (*Allium sativum*), suspensão de *Bacillus subtilis* na concentração de 10^8 ufc, Acibenzolar-S-methyl (ASM) 0,04 g/L, o fungicida (piraclostrobina e epoxiconazole) como controle positivo e água como testemunha. Em seguida, as bandejas foram envolvidas por saco plástico transparente e acomodadas em câmara de crescimento à temperatura de 25°C, por 24 horas. Após esse tempo retiraram-se amostras dos folíolos, as quais foram transferidas para solução fixativa (Karnovsky modificado). Após 24 horas, realizou-se o preparo das amostras para MEV. Nas observações, pôde-se constatar que os tratamentos empregados interferiram no desenvolvimento do patógeno, com exceção do ASM. Neste, os esporos se apresentaram normais, enquanto nos demais tratamentos, comparados à testemunha, observou-se que os urediniósporos encontravam-se totalmente murchos, com exceção do tratamento com extrato de bulbo de alho, que apresentou inibição da germinação dos urediniósporos. Com base nessas imagens, pôde-se concluir que tanto os óleos quanto o extrato de alho e a suspensão de *B.subitlis* apresentam potencial para o controle da *P. pachyrhizi*.

*Comitê de orientação: Eduardo Alves - UFLA (Professor Orientador); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

MEDICE, Regiane. Alterações provocadas por óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e suspensão de *Bacillus subtilis* sobre os urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: **Alternative Products to Control Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*)**, 2007. Cap 5, p.81-94. Master Dissertation (MSc in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras- MG*, Brazil.

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used in this research work to screen the effects of various products over the development of *Phakopsora pachyrhizi*. Soybean leaves infected with the pathogen were collected and conditioned inside plastic trays filled with astringent paper soaked with distilled water. After this procedure, all treatments were pulverized over the leaves. There a total of nine treatments plus an absolute control. *Corymbia citriodora* 0,1%, *Cymbopogon nardus* (L.), 0,05%, *Azadirachta indica* 0,1%, *Melaleuca alternifolia* 0,06%, *Thymus vulgaris* and garlic bulb extract 20% (*Allium sativum* L.), extrato de *Bacillus subtilis* 10^8 cfu, Acibenzolar-S-Methyl (ASM) 0,04 g/L and a commercial fungicide as a positive control and distilled water as absolute control. After pulverization with the treatments, trays were covered with plastic and conditioned inside controlled growth chambers at a 25 °C temperature, during a 24 hour period. After this time, leaf samples were extracted and transferred to a Karnovsky modified solution. After 24 hours, samples were prepared to be submitted to SEM. By the SEM observations, it could be seen that the treatments tested were able to interfere in the pathogen's development, with the exception to ASM. Only in this treatment the spores were seen normal, while in the others, when compared to the controls, the urediniospores were seen totally wilted, with exception to the treatment with garlic bulb extract, which presented effect over the germination of the urediniospores. Based on these images, it can be concluded that the essential oils the garlic bulb extract and *B. subtilis* suspension present a potential to be used as control measures against *P. pachyrhizi*.

* Supervising Committee: Eduardo Alves - UFLA (Supervisor); Luis Antônio Augusto Gomes - UFLA (Co-Supervisor).

1 INTRODUÇÃO

A microscopia eletrônica é uma importante ferramenta de estudos ultra-estruturais, 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.

Vários trabalhos têm sido realizados visando potencializar o uso de produtos à base de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. Entretanto, há certa deficiência em estudos com microscopia eletrônica de varredura e transmissão na investigação de como esses produtos interferem no desenvolvimento do patógeno.

Dessa maneira, com o presente trabalho teve-se o objetivo de estudar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, dentro do patossistema *Phakopsora pachyrhizi* x soja, os efeitos de diversos produtos, tais como extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, sobre esse patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento e coleta de material

O experimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Folíolos de soja do cultivar MGBR46 com sinais do patógeno foram coletados em plantas mantidas em casa de vegetação e acondicionados em sacos plásticos.

2.2 Tratamentos empregados

Os tratamentos, com as respectivas concentrações, empregados neste ensaio foram: os óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela) 0,05%, *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) 0,1%, *Azadirachta indica* (nim) 0,1%, *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) 0,06%, *Thymus vulgaris* (tomilho) 0,03%, extrato de bulbos de alho (*Allium sativum*) 20%, suspensão de *Bacillus subtilis* isolado AP3 a 10^8 ufc, acibenzolar-S-metyl (Bion[®]), 0,04g/L, um fungicida piraclostrobina + epoxiconazol (marca comercial Opera[®]), 0,2ml/L e água como testemunha .

2.3 Método utilizado na montagem do ensaio

O método utilizado neste ensaio foi o da folha destacada. Essa técnica tem sido empregada em muitos estudos envolvendo relações patógeno-hospedeiro com parasitas obrigatórios, especialmente as ferrugens, utilizando folhas ou pedaços de folhas (Clinton e McCormick, 1924; Silverman, 1957; Browder, 1964; Hooker e Yarwood, 1966; Wilcoxson et al., 1974). Neste ensaio, utilizaram-se

dez bandejas plásticas com papel de filtro umedecido com água destilada e cobertas com papel alumínio. Logo após o preparo das bandejas, foram acondicionados três folíolos de soja em cada uma, perfurando-se, com a haste do folíolo, o papel alumínio, para que o mesmo pudesse manter contato com o papel umedecido. Em seguida, com pulverizadores manuais, foram aplicados os tratamentos. Após esse procedimento, as bandejas foram envolvidas com saco plástico transparente e levadas à câmara de crescimento, a temperatura de 25°C, por 24 horas. Passado esse período, as bandejas foram retiradas da câmara de crescimento e coletaram-se amostras para o preparo da análise ultra-estrutural.

2.4 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura

A preparação e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Depois de o material ser imerso em solução fixativa (Karnovsky modificado), pH 7,2, por, no mínimo, 24 horas, fragmentos dos folíolos medindo, aproximadamente, 0,5 x 0,5 cm foram transferidos para solução tampão de cacodilato. As secções obtidas foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água, por 2 horas, depois lavadas em água destilada por três vezes e, subseqüentemente, desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Em seguida, foram levadas para o aparelho de ponto crítico.

Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura Leo Evo 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, com aumento de 20µm, nas condições de trabalho de 20 kV e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software do pacote Corel Draw 12, selecionadas e preparadas as pranchas apresentadas neste trabalho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Efeito de óleos essenciais, extrato de alho e acibenzolar-S-methyl na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*

Na Figura 1 encontram-se observações realizadas no MEV. Pode-se constatar que, nos folíolos provenientes da testemunha e do tratamento com acibenzolar-S-methyl (ASM) da cultivar MG/BR 46 (Conquista), os soros urediniais eram bem desenvolvidos e com um grande número de urediniósporos germinando, os quais se encontravam túrgidos (Figura 1C e 1D). Pode-se concluir que o ASM não apresentou efeito sobre os urediniósporos do fungo.

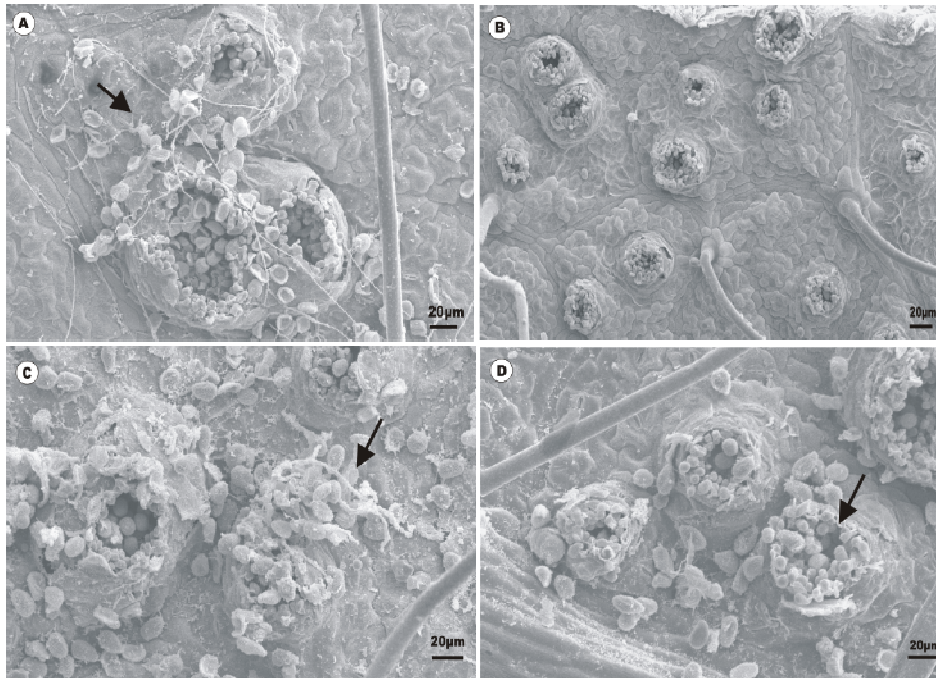


FIGURA 1: Eletromicrografias de varredura em folhas de soja infectada com *P. pachyrhizi*. (A) Urediniósporos germinando na superfície da folha do hospedeiro quando tratado com água; (B) formação de soros uredinais; (C e D) tratamento com acibenzolar-S-methyl.

Nas amostras tratadas com óleos *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (citronela) *Azadirachta indica* (nim), *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho), comparadas ao tratamento do fungicida, verificou-se que os urediniósporos encontravam-se murchos (Figura 2A). Até mesmo no interior dos soros uredinais os urediniósporos murcharam quando em contato com o produto (Figura 2C e 2D), indicando que os óleos essenciais exercem efeito direto sobre o patógeno. Como verificado por Zambonelli et al. (1996) com outros fitopatógenos, o óleo de

tomilho foi capaz de causar degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular de *Colletotricum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*. Tal dano pode ter ocorrido com os urediniósporos neste trabalho, tornando-os inviáveis para a germinação, desde que tem sido comprovado que estes são muito sensíveis.

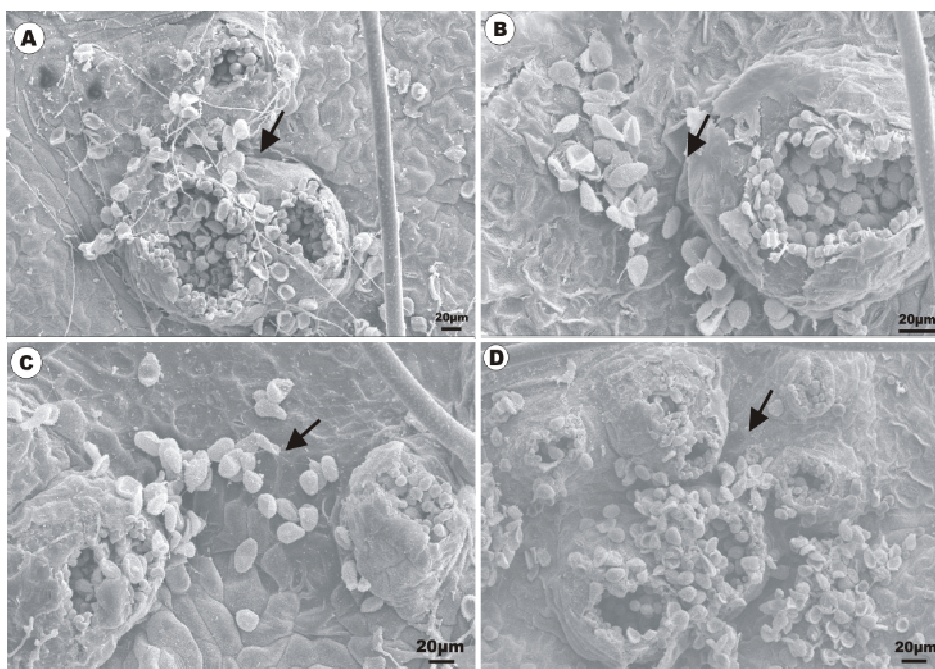


FIGURA 2: Eletromicrografias de varredura de folhas de soja (cultivar MG/BR 46 (Conquista)) infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*, submetida à aplicação óleos essenciais. (A) Soros urediniais em folhas tratadas com água. (B) Soros urediniais em folhas que receberam aplicação de fungicida (C) Soros urediniais em folhas que receberam aplicação com óleo essencial de citronela a 0,05%. (D) soros urediniais em folhas tratadas com óleo de eucalipto citriodora a 0,1%.

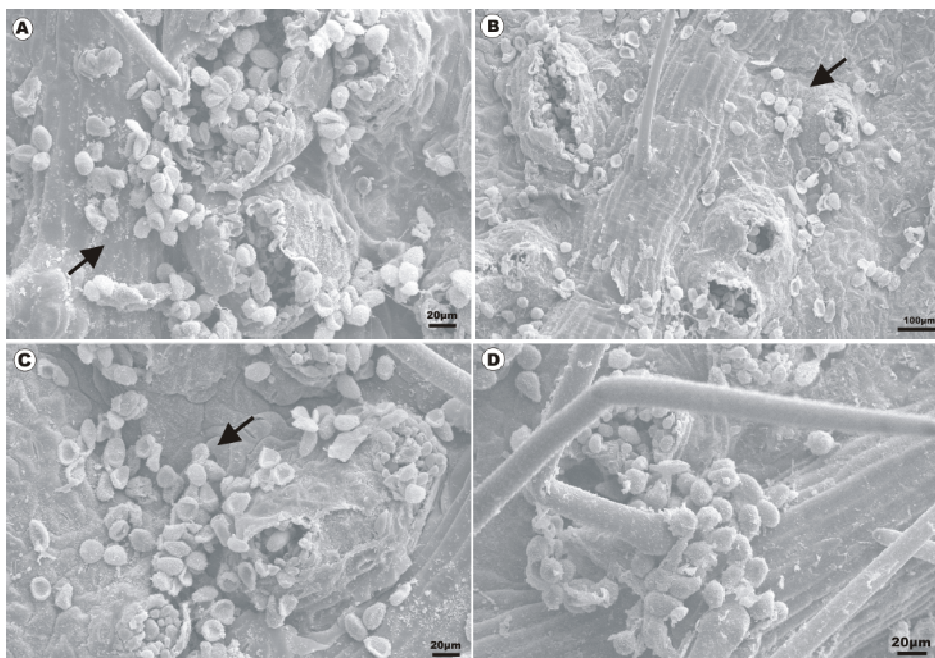


FIGURA 3: Eletromicrografias de varredura de folhas de soja (cultivar MG/BR 46 (Conquista)) infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*, submetida à aplicação óleos essenciais e extrato de alho. (A) Soros urediniais em folhas que receberam aplicação de óleo essencial de melaleuca a 0,06%. (B) Soros urediniais em folhas que receberam aplicação de óleo essencial de nim a 0,1%. (C) Soros urediniais em folhas que receberam aplicação de óleo essencial de tomilho a 0,03% (D) soros urediniais em folhas que receberam aplicação de extrato de alho a 20%.

Em relação ao tratamento com extrato de bulbos de alho, verificou-se inibição de germinação dos esporos quando comparado à testemunha (Figura 3D).

Os óleos essenciais tiveram efeito fungicida direto sobre os urediniósporos, quando comparados ao controle positivo, enquanto que, para o

extrato de bulbos de alho, o efeito na inibição da germinação dos urediniósporos pode estar relacionado a outros fatores que deverão ser investigados, como, possivelmente, ação fungistática ou fungitóxica.

3.2 Efeito da suspensão de *Bacillus subtilis* na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*

A suspensão de *B. subtilis* apresentou resultado satisfatório. Nas imagens analisadas observaram-se ausência de germinação e murcha dos urediniósporos (Figuras 4B, 4C e 4D) enquanto que a testemunha emitiu tubos germinativos (Figura 4A). Constatou-se que esse extrato é um agente de controle para ferrugens. Bettiol & Varzea (1992) verificaram que *Bacillus subtilis* inibiu a germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Centurion (1991) e Mizubuti (1992), em relação a *Uromyces appendiculatus*, com o uso de extratos concentrados de células formuladas de *B. subtilis* e com suspensão de células da bactéria.

Diante dos resultados, a suspensão de *B. subtilis* se apresenta como um agente de controle com grande potencial para ferrugens. Todavia, não há relatos de trabalhos utilizando a suspensão de *B. subtilis* contra *P. pachyrhizi*. Os resultados apresentados neste trabalho são os primeiros obtidos visando o controle biológico de *P. pachyrhizi*, entretanto, mais estudos são necessários.

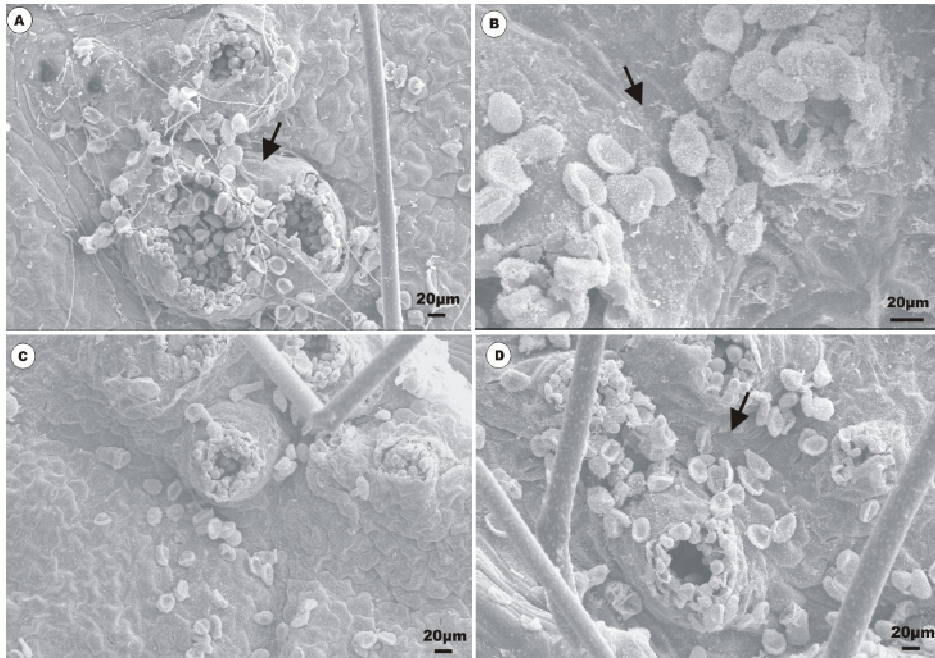


FIGURA 4: Eletromicrografias de varredura de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*. (A) Urediniósporos submetidos à aplicação de água. (B, C e D) Controle biológico com *Bacillus subtilis*, sobre urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

4 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que os óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, melaleuca, nim e tomilho afetam a germinação e causam alterações nos urediniósporos e o extrato de bulbo de alho afeta a germinação, mas não provocam alterações visíveis nos urediniósporos.

Verificou-se que a suspensão de *Bacillus subtilis* apresenta potencial como controle biológico de *Phakopsora pachyrhizi*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W.; VARZEA, V. M. P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 91-95, 1992.

BROWDER, L. E. Modified detached-leaf culture technique for study of cereal rusts. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, n.8, p. 906-908, 1964.

CENTURION, M. A. P. C. Controle biológico de ferrugem (*Uromyces phaseolorum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*).In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p. 365-382.

CLINTON, G. P.; McCORMICK, F. A. Rust infection of leaves in Petri dishes. **Connecticut Agric. Exp. Station**, New Haven, n. 260, p. 475-501, 1924.

HOOKE, A. L.; YARWOOD, C. E. Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves and *Oxalis corniculata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 56, p. 536-539, 1966.

MIZUBUTI, E. S. G. **Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis***. 1992. 87 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SILVERMAN, W. B. The development of *Puccinia graminis* var. *tritici* on detached leaves of wheat as influenced by nutrients and metabolite antagonist. **Phytopathology**, St. Paul, v. 56 n. 47, p. 31-31, 1957.

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, n. 58, p. 1085-1087, 1974.

ZAMBONELLI, A.; D'AURELIO, A. Z.; BIANCHI, A.; ALBASIN, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491-494, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ferrugem asiática da soja é um dos principais problemas fitossanitários da cultura. O controle da doença tem exigido combinação de práticas culturais, a fim de que sejam minimizados os danos e as perdas. Entre os métodos de controle, o único disponível, no momento, é o químico, por meio de fungicidas. Estratégias de controle, como a utilização de produtos alternativos como óleos essenciais, extrato de plantas e controle biológico, são desejáveis para o manejo eficiente da cultura, principalmente para o sistema orgânico, para o qual não existem produtos alternativos disponíveis, o que dificulta o manejo da doença.

Neste trabalho, verificou-se que é possível utilizar produtos à base de plantas medicinais no controle da severidade da ferrugem asiática da soja tanto em cultivos orgânicos como em convencionais.

Os resultados verificados por meio da microscopia eletrônica de varredura mostraram que tanto óleos essenciais como extrato de bulbo de alho e, até mesmo, o agente de controle biológico podem interferir na morfologia e na fisiologia do patógeno. Esses resultados, de certa forma, são interessantes, uma vez que este trabalho é pioneiro no patossistema *Phakopsora pachyrhizi* x soja.

Novos estudos devem ser iniciados para se estabelecer as melhores doses, quais óleos e extratos de plantas seriam economicamente viáveis e para confirmar quais os mecanismos de atuação dos mesmos no controle do patógeno.

Portanto, as pesquisas com produtos alternativos no controle das doenças de plantas não devem se restringir apenas aos laboratórios e, sim devem ser realizadas em maiores extensões, desde a casa de vegetação até o campo.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância sobre efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais e suspensão de bulbos de alho sobre a inibição da germinação de uredinósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	34
TABELA 2A	Resumo da análise de variância sobre os efeitos de óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e suspensão de <i>Bacillus subtilis</i> sobre o desenvolvimento de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em plantas de soja mantidas em casa de vegetação (1º experimento)...	50
TABELA 3A	Resumo da análise de variância sobre os efeitos de óleos essenciais, extrato de bulbo de alho e suspensão de <i>Bacillus subtilis</i> sobre o desenvolvimento de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em plantas de soja mantidas em casa de vegetação (2º experimento).....	51
TABELA 4A	Tratamentos com produtos alternativos e épocas de aplicação.....	67

TABELA 5A	Resumo da análise de variância sobre a severidade da ferrugem da soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>) em função da aplicação de óleos essenciais e extratos em três épocas. Dados avaliados com base na escala diagramática.....	70
-----------	---	----

TABELA 2A: Resumo da análise de variância sobre análise de variância referente ao primeiro experimento.

Teste Scott-Knott (1974) para a FV TRAT

NMS: 0,05

Variável analisada: NUMERO DE PUSTULAS
 Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	8.95	0.99	4.64	0.0007
erro	30	6.44	0.21		
Total corrigido	39	15.39			
CV (%) =	33.04				
Média geral:	1.40		Número de observações:	40	

Média harmônica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,23

TABELA 3A: Resumo da análise de variância sobre análise de variância referente ao segundo experimento.

Teste Scott-Knott (1974) para a FV TRAT

NMS: 0,05

Variável analisada: NUM._PUSTU
 Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	82.50	9.17	2.88	0.014
erro	30	95.63	3.19		
Total corrigido	39	178.13			
CV (%) =	38.13				
Média geral:	4.69		Número de observações:	40	

Média harmônica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,89

TABELA 5A: Resumo da análise de variância para a variável severidade.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	210.864017	105.432009	6.246	0.0099
TRATAMENTOS	8	1172.638054	146.579757	8.684	0.0001
erro 1	16	270.068405	16.879275		
ÉPOCA	2	3131.435202	1565.717601	18.810	0.0092
erro 2	4	332.949079	83.237270		
TRAT*EPOCA	16	1519.587886	94.974243	6.832	0.0000
erro 3	32	444.827899	13.900872		
Total corrigido	80	7082.370543			