

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum
gloeosporioides* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE
MAMOEIRO**

LAHYRE IZAETE SILVEIRA GOMES

2008

LAHYRE IZAETE SILVEIRA GOMES

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MAMOEIRO

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

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Alves

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

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

Gomes, Lahyre Izaete Silveira.

Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro / Lahyre Izaete Silveira Gomes. – Lavras : UFLA, 2008.

54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. *Carica papaya*. 2. Pós-colheita. 3. Estádio de maturação. 4. *Syzygium aromaticum*. 5. *Cymbopogon citraus*. 6. Fumigação e imersão. I.

Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.651

LAHYRE IZAETE SILVEIRA GOMES

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MAMOEIRO

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

APROVADA em 28 de julho de 2008.

Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro	UFLA
Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Enilton Nascimento de Santana	INCAPER

Prof. Dr. Eduardo Alves
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

*Ao meu pai **Joaquim Gomes Barbosa** (in memória), meu exemplo de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e me protege.

Ao meu pai Joaquim Gomes Barbosa (*in memória*), que foi a pessoa que mais me ensinou, com o seu jeito correto de ser.

À minha mãe Joaquina pela força dada durante esta fase de minha vida.

Aos meus lindos irmãos, Pablo e Pâmela, por existirem.

Ao Diogo, pelo incentivo e companheirismo durante os meus estudos.

Ao professor Eduardo Alves, pela orientação deste trabalho e pela confiança durante a execução do mesmo.

Ao professor Hilário Antônio de Castro, pela grande ajuda.

Ao pesquisador Enilton Nascimento Santana, pelo apoio incondicional.

Ao Cristiano Lima, pela amizade e sugestões.

Ao colega Eudes, pela ajuda nas análises estatísticas e amizade.

Ao professor Ludwig, pelo apoio e amizade.

Aos colegas Fernanda, Diego, Rejane, Jucylaine, Rosana, Amanda, Renata, Luciane, Daniel, Márcia, André, Ricardo e Maurício pelo companheirismo.

Aos amigos da clínica Eliane, Rute, Bruno e Vladimir pela ajuda e boa vontade dedicados neste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao INCAPER e a CALIMAN, por permitir a realização de parte deste trabalho.

A todos os professores do departamento que contribuíram para a minha formação.

Aos professores da UNIMONTES, Adelica, Regina e Edson, pela amizade.

Aos amigos Fernanda e Jader, pela amizade e consideração durante esta fase da minha vida.

À secretária Renata Kelly, pelo alto astral.

Às minhas amigas Virgínia, Flávia, Lucivânia, Karla, Layla, Aline, Sydia, Carla, Mirelly, Líbia e Aliesse, mesmo longe vocês sempre estarão presentes em minha vida.

À minha prima Vanete e às minhas tias Dilva, Maria e Deldi, pela força que me deram quando perdi o meu pai.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que mais esta etapa fosse concluída.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	01
REFERENCIAL TEÓRICO	03
CAPÍTULO 1 Métodos de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de mamão.....	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4 CONCLUSÕES	25
5 AGRADECIMENTOS	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2 Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro.....	28

RESUMO	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
3 RESULTADOS	38
3.1 Efeito <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	38
3.2 Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose em frutos de mamão....	41
4 DISCUSSÃO	46
5 AGRADECIMENTOS	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	Métodos de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de mamão	
TABELA 1 -	Médias dos diâmetros das lesões de antracnose em frutos de mamão, resultantes da inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos em diferentes estágios de maturação, utilizando duas metodologias de inoculação. UFLA, Lavras-MG, 2008.....	22
CAPÍTULO 2	Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro	
TABELA 1 -	Diâmetro médio (cm) das lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais em diferentes concentrações pelo método de contato (imersão) a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.....	41
TABELA 2 -	Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais em diferentes tempos pelo método de contato (imersão) a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.....	43
TABELA 3 -	Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais pelo método de fumigação em diferentes concentrações a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.....	44
TABELA 4 -	Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais pelo método de fumigação avaliados em dois tempos à temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.....	45

LISTA DE FIGURAS

- CAPÍTULO 1** Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão
- FIGURA 1 -** Frutos de mamão ‘Golden’ com 5 ferimentos feitos com auxílio de agulha de metal nº 6 (A), ferimentos feitos simultaneamente com conjunto de 22 agulhas entomológicas tamanho 7. UFLA, Lavras-MG, 2008.....21
- FIGURA 2 -** Frutos de mamão ‘Golden’ em diferentes estágios de maturação com ferimentos feitos com agulha de metal nº 6 (A), e com conjunto de agulhas entomológicas tamanho 7 (B), após 5 dias de inoculação com *C. gloeosporioides*. UFLA, Lavras-MG, 2008.....23
- CAPÍTULO 2** Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro
- FIGURA 1 -** Efeito *in vitro* de concentrações de óleos essenciais, medido pelo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo. Concentrações: 75; 150; 300 e 600 ppm. Método de contato. UFLA, Lavras-MG, 2008.....38
- FIGURA 2 -** Contraste das médias do IVCM de *C. gloeosporioides* em BDA entre os 3 óleos nas 4 concentrações (ppm) e a testemunha (água) por fumigação (A); entre os 3 óleos nas 4 dosagens e a testemunha (BDA) por contato (B); entre os 3 óleos nas 4 dosagens e o fungicida Tecto® por contato (C) UFLA, Lavras-MG, 2008.....40
- FIGURA 3 -** Contraste das médias do diâmetro das lesões de antracnose em frutos de mamão entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e a testemunha pelo método de fumigação (A); entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e a testemunha pelo método de imersão (B); entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e o fungicida (Tecto) pelo método de imersão (C).UFLA,Lavras-MG.....42

RESUMO

GOMES, Lahyre Izaete Silveira. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro.** 2008. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

O trabalho foi desenvolvido em dois experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo estabelecer um método simples e confiável de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão combinado com o estágio de maturação do fruto para reproduzir sintomas de antracnose em laboratório. Frutos de mamão nos estádios de maturação 1 (com até 15% da casca amarela), 2 (com até 25 % da casca amarela) e 3 (com até 50% da casca amarela) foram feridos de duas formas e posteriormente foram inoculados com uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides*. Os frutos foram submetidos à câmara úmida por 48 horas, sendo armazenados à temperatura variando de 23 a 27 °C. A avaliação do ensaio foi realizada aos 5 dias após a inoculação, onde foi medido o diâmetro das lesões de antracnose. Os estádios de maturação 2 e 3 associados ao tipo de ferimento 1 - cinco ferimentos feitos com agulha de metal nº 6, mostraram-se mais eficientes na reprodução de sintomas de antracnose em condição de laboratório. Já no segundo experimento o objetivo foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* pelo método de fumigação e de contato (imersão) sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* *in vitro* e *in vivo*. Dos óleos essenciais utilizados *in vitro*, o que foi mais eficiente na redução do crescimento micelial do fungo por contato foi o óleo de *S. aromaticum*. Pelo método de fumigação os tratamentos, exceto o de *C. citratus* na menor concentração inibiram o crescimento total do fungo. No teste *in vivo* o óleo essencial de *S. aromaticum* mostrou-se promissor para o controle da doença nos frutos pelo método de imersão.

*Comitê de orientação: Prof. Dr. Eduardo Alves - UFLA (Orientador); Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro - UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

GOMES, Lahyre Izaete Silveira. **Methods of inoculation of *Colletotrichum gloeosporioides* and effect of essential oils in the control of the antracnose in papaya fruits.** 2008. 54p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

This study was composed by two experiments. The first experiment aimed to establish a simple and reliable method to inoculate *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruits. The methods studied combined the maturation stage and two types of wounding to reproduce antracnose symptoms in the laboratory. Papaya fruits in the 1 (with up to 15% of the yellowing skin), 2 (with up to 25% of the yellowing skin) and 3 (with up to 50% of the yellowing skin) maturation stages were wounded in two ways with needle number 6 and entomologic needle number 7 and then inoculated with a conidial suspension containing 2.5×10^6 conidia/mL of *C. gloeosporioides*. The fruits were kept in moist chamber during 48 hours, being stored at 23 to 27 °C. The evaluation of antracnose symptoms was carried out 5 days after inoculation, where the diameter of the antracnose lesions was measured. The maturation stages 2 and 3 associated with wound type 1 - five wounds made with a needle, showed to be efficient in the reproduction of antracnose symptoms in laboratory conditions. In the second experiment the objective was to evaluate the effect of the essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* using the fumigation and contact (immersion) methods on the micelial growth of *C. gloeosporioides* *in vitro* and *in vivo*. From the essential oils used *in vitro*, the most efficient in reducing the micelial growth by contact was the oil of *S. aromaticum*. By the fumigation treatment, except to *C. citratus* oil, in the lowest concentration, inhibited totally the growth of the fungus. In the *in vivo* test the essential oil of *S. aromaticum* showed to be promising for the control of the disease on the fruits by the immersion method.

*Advising committee: Prof. Dr. Eduardo Alves - UFLA (Advisor); Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro - UFLA (Co-advisor).

INTRODUÇÃO

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo utilizada amplamente em dietas alimentares pelo seu valor nutritivo e digestivo (Toda fruta, 2003). O Brasil é o maior produtor mundial da fruta e, em 2006, produziu 1.573.819 toneladas. Também se destaca como um dos principais exportadores perdendo apenas para o México (Agriannual, 2008).

A antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., constitui-se na doença mais importante incidente sobre frutos maduros em regiões produtoras do mundo. A doença é muito significativa para a economia, pois os frutos atacados pelo *Colletotrichum gloeosporioides* tornam-se inadequados para a comercialização e consumo. Ainda que estes não apresentem os sintomas nas condições de campo, a doença se manifesta posteriormente na fase de embalagem, transporte, amadurecimento e comercialização, causando grande porcentagem de perdas (Oliveira & Santos Filho, 2000).

Para o controle da doença na pós-colheita utiliza-se o tratamento hidrotérmico e fungicidas químicos (Ventura et al., 2003). Com restrição ao uso de fungicidas devido à resistência pelo patógeno, à fitotoxicidade e aos efeitos residuais que são maléficis à natureza, devem-se buscar medidas alternativas de controle tais como o uso de produtos naturais eficientes e de baixo impacto ambiental. Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para uma utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (Moreira et al., 2002). Atualmente uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de óleos extraídos de plantas, buscando explorar suas

propriedades fungitóxicas. A literatura tem registrado a eficiência de óleos essenciais, obtidos de uma gama enorme de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi buscar uma metodologia de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão combinada com um estágio de maturação do fruto, para que possa reproduzir sintomas da doença em laboratório e buscar uma alternativa de controle para a antracnose do mamão em pós-colheita.

REFERENCIAL TEÓRICO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pertencente à família Caricaceae, é uma fruteira originária da América tropical que se disseminou para várias regiões do mundo (Ritzinger & Souza, 2000). Da planta do mamoeiro extraem-se látex que contém papaína, que é uma enzima com propriedades digestivas empregada em culinária (digestão, amaciamento de carnes), em indústria (cerveja, queijo, chicletes, couro) e em farmacêutica (produtos para dispepsias). Da folha, fruto e semente extraem-se um alcalóide - a carpaina - empregado em medicina como ativador do músculo cardíaco. O fruto tem a polpa saborosa, aromática e suave a qual é consumida ao natural, só ou em mistura com polpas de outros frutos, sob forma de purês, cremes gelados, cubos cristalizados, sucos. Processada a polpa compõe doces, geléias, compotas, polpa congelada e aguardente (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária - SEAGRI, 2008).

Estudo realizado por Siqueira (2003) revela que entre 1961 e 2002 a produção mundial de mamão apresentou elevado crescimento, com o Brasil acompanhando essa tendência de expansão e tornando-se grande produtor e exportador mundial. Tal crescimento da produção representou geração de emprego e renda em várias partes do mundo, especialmente nas regiões com altos índices de desemprego, baixos níveis de renda e elevados índices de desnutrição do planeta.

O Brasil é o maior produtor mundial de mamão e em 2006, apresentou uma produção de 1.573.819 toneladas. Na seqüência os maiores produtores são México, Índia e Nigéria com uma produção de 805.672, 783.383 e 759.000 toneladas, respectivamente (Agrianual, 2008). A maior parte da produção do Brasil está concentrada no norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Embora seja o maior produtor, com aproximadamente 25 % da produção mundial, o Brasil

exporta em torno de 2 % de sua produção. E um dos principais fatores limitantes à exportação são as doenças pós-colheita (Liberato & Zambolim, 2002).

Há inúmeras doenças pós-colheita, dentre elas as fúngicas são: antracnose, mancha-chocolate, podridão de lasiodiplodia, podridão de rhizopus, podridão de fusarium, podridão de phomopsis, podridão de alternaria e podridão de stemphylium (Liberato & Zambolim, 2002).

Sendo considerado um dos principais problemas para a comercialização de frutos, a antracnose é encontrada em todas as áreas produtoras de mamão do mundo. Os frutos atacados por essa doença tornam-se inviáveis para a comercialização e consumo e, mesmo que os sintomas não sejam diagnosticados no campo, eles podem aparecer na fase de amadurecimento, transporte, embalagem e comercialização (Oliveira & Santos Filho, 2000).

A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., o qual coloniza os tecidos e forma acérvulos subepidérmicos com setas escuras, conidióforo cilíndricos com conídios hialinos, unicelulares, numerosos e aglutinados por uma substância gelatinosa de coloração rósea, visível facilmente nas superfícies apodrecidas. A forma perfeita corresponde a *Glomerella cingulata* Ston, que forma peritécios marrons, ostiolados, isolados ou em grupos, incrustados em estroma preto, sem paráfises. As ascas são oblongas, quase claviformes e contêm no seu interior 8 áscosporos, hialinos, unicelulares e cilíndricos (Sutton, 1992; Oliveira & Santos Filho, 2000).

Os sintomas da antracnose nos frutos iniciam-se com pequenas manchas rosadas, não deprimidas, de aspecto seco e bordo definido, sobre a superfície em maturação, posteriormente, essas lesões tornam-se arredondadas e aumentam de tamanho, sendo formadas lesões deprimidas, circulares, de coloração escura, que podem atingir até 5 cm de diâmetro. Em torno das manchas forma-se um halo aquoso, com coloração diferente da parte central. Quando em grande quantidade as lesões podem coalescer; espalham-se pela superfície do fruto, penetram e

aprofundam-se na polpa, ocasionando uma podridão mole. A frutificação do fungo concentra-se na parte central da lesão, que toma um aspecto gelatinoso de coloração rósea. Os frutos jovens, quando atacados, cessam o seu desenvolvimento, mumificam e caem (Oliveira & Santos Filho, 2000; Liberato & Zambolim, 2002).

As condições favoráveis a esta doença são alta umidade relativa do ar e temperatura entre 25 e 30 °C (Tatagiba et al., 2002).

O controle da doença deve ser realizado em campo, seguido de cuidados essenciais e preventivos, na pós-colheita. O tratamento pós-colheita dos frutos é uma forma de controlar o micélio quiescente e protegê-los de infecções secundárias, durante o armazenamento e transporte para os mercados consumidores (Ventura et al., 2003).

Na pós-colheita, tem sido utilizado o controle hidrotérmico combinado com o controle químico (Ventura et al., 2003). Inúmeros fungicidas utilizados para o controle da antracnose podem se tornar ineficientes devido à ocorrência de resistência do patógeno, além de causar fitotoxidez nos frutos e deixar resíduos, o que pode causar inúmeros danos ao ambiente e a saúde humana.

Uma das alternativas no controle de doenças é o uso de produtos naturais, eficientes e de baixo impacto ambiental.

Óleos essenciais

Segundo a ISO (International Standart Organization) os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pela prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral são substâncias orgânicas voláteis, as quais são muito conhecidas pelo aroma que caracteriza certas plantas (Martins et al., 2000).

A composição química dos óleos essenciais é a mistura de várias moléculas orgânicas, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos, mas sempre há predominância de umas sobre as outras, tendo, normalmente um composto majoritário (Cardoso et al., 2000; Negraes., 2003). Pesquisas com óleos essenciais revelam a existência de uma grande quantidade de compostos secundários tais como alcalóides, terpenos, flavonóides e esteróides que podem ser utilizados para controlar fitopatógenos (Silva et al., 2005).

Os óleos essenciais são muito utilizados na área de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene) e farmacêuticos. Os óleos puros frequentemente apresentam toxicidade elevada tanto que se recomenda sua utilização em pequenas dosagens (Cardoso et al., 2000). Nas plantas estes óleos desenvolvem funções que estão relacionadas com sua volatilidade, agindo na proteção contra predadores e patógenos, na atração de polinizadores, perda de água, aumento da temperatura e também desempenhando funções ecológicas, especialmente como as de inibidores de germinação. Tais características tornam as plantas produtoras de óleos essenciais poderosas fontes de agentes biocidas, sendo amplamente estudadas na agricultura, principalmente devido às atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (Craveiro & Machado, 1986).

A literatura tem registrado a eficiência de óleos essenciais, na inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica, inibindo o crescimento micelial e também induzindo a lise e evacuação do citoplasma. A inibição do crescimento do fungo promovida por óleo essencial frequentemente envolve a indução de mudanças na composição da parede celular, destruição na membrana plasmática e desorganização na estrutura mitocondrial entre outros (Kishore & Pande, 2007).

Várias espécies de plantas medicinais são ótimas produtoras de óleos essenciais, além de algumas já terem sido testadas no controle de fungos. O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) pertence à família Labiatae, originário da Europa tem no seu óleo essencial, vários compostos como: timol, carvacol, cimol, linalol, cimeno e pineno (Martins et al., 2000). Na literatura não há relatos de toxicologia desta planta (Martins et al., 2000; Negraes, 2003). O óleo de tomilho reduziu a severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em casa de vegetação (Medice et al., 2007), e em trabalho realizado por Pereira, R. (2006), mostrou eficiente no controle de *Cercospora coffeicola*.

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é muito utilizado como planta medicinal, onde as partes mais utilizadas são os botões florais e o óleo essencial (Negraes, 2003). Chalfoun et al. (2004), avaliaram o efeito in vitro do óleo essencial de cravo nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg/mL, sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* e constataram uma inibição do desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600 mg/mL, exceto para o fungo *Penicillium* spp. que foi verificado na concentração de 800 mg/mL.

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*) também conhecido por capim-cidreira, capim-cidrô e erva-cidreira é uma planta de origem Asiática que pertence à família Poaceae (Castro & Ramos, 2003). É uma planta que produz uma boa quantidade de óleo essencial e este é muito utilizado como aromatizante em perfumaria e cosmética, porém, seu maior emprego é na indústria farmacêutica para síntese de compostos importantes (Guimarães & Cardoso, 2007). O citral é o seu principal constituinte químico, seguido por outros compostos, como o mirceno além de vários aldeídos, cetonas e álcoois (Pereira, A., 2006). O óleo essencial de capim-limão inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia solani* na concentração de 250 ppm e dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* na

concentração de 500 ppm (Guimarães & Cardoso, 2007). Em trabalho realizado por Marques et al. (2003) o óleo essencial de capim limão a 1,0 e 1,5% inibiu o crescimento de *C. gloeosporoides* em 18,6 e 19,9% respectivamente, em frutos de mamão.

Todas estas plantas citadas anteriormente produzem várias substâncias as quais podem ter efeito nocivo ao fungo causador da antracnose no mamoeiro.

A fumigação continua sendo o método mais comum de controle no tratamento quarentenário. Os fumigantes são, na maioria das vezes, mais baratos e de fácil uso, mas tendem a ser substituídos por outros métodos de controle, devido ao seu efeito nocivo sobre o meio ambiente e sobre a saúde pública (Chitarra & Chitarra, 2005).

Entretanto o método de fumigação não é muito utilizado para o controle de doenças pós-colheita de frutas e vegetais, apesar dos fumigantes possuírem importantes propriedades que os tornam úteis para prevenir doenças fúngicas. Os fumigantes penetram em áreas inacessíveis aos pesticidas líquidos e exercem seu efeito durante o período de exposição deixando pouco ou nenhum resíduo (Sholberg et al., 2004).

Os óleos essenciais por serem substâncias voláteis podem exercer uma ação fumigante contra os fungos incidentes na pós-colheita de frutos, sendo uma alternativa no controle de doenças. E sua ação como fumigante já foi comprovada em vários trabalhos (Lee et al., 2007; Pimentel, 2007).

Para que estudos sobre o controle da antracnose possam ser realizados durante a fase de pós-colheita, é preciso desenvolver uma metodologia de inoculação que envolva o estágio de maturação do fruto, a fim de simular as condições reais de tratamento. Existem várias metodologias de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão, mas não há relação com o estágio de maturação. Andrade et al.(2007), feriram superficialmente frutos de mamão com uma agulha esterilizada, e com auxílio de um cotonete embebido

em uma suspensão de 2×10^6 conídios/ mL de *C. gloeosporioides* espalhou o inóculo sobre o ferimento. Garcia et al.(2008) feriram frutos de mamão com uma agulha e sobre o ferimento inocularam uma suspensão de $1,0 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. Agriannual. **Mamão**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. 504 p.
- CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. L. S. **Óleos essenciais**. Lavras: UFLA, 2000. 42 p.
- CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 28 p. (Boletim FEPAGRO, 11).
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 23, p. 54-63, 1986.
- GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIÉGAS-AQUIJE, G. M. F.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 163-168, 2008.
- GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KISHORE, G. K.; PANDE, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot disease in peanut. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 4, p. 375-380, 2007.

LEE, S. L.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; LIM, H. K.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Honolulu, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em mamoeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 1023-1170.

MARQUES, S. S.; SANTOS, M. P.; ALVES, E. S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de mamoeiro. In: _____. **Papaya Brasil**. [S.l.: s.n.], 2003. p. 591-593.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220 p.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T. de; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L.; ALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; LIMA, M. L. R. Z.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós-colheita de *Monilia Fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 395-398, 2002.

NEGRAES, P. **Guia de A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267 p.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO. Doenças do mamoeiro. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Org.). **Mamão: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. v. 11, p. 37-46.

PEREIRA, A. de A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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 Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação fungitóxica e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de Cipó Vick (*Tanaecium nocturnum*) e João Brandim (*Piper piscatorum*)**. 2007. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. da S. Fitossanidade na exportação do mamão. In: _____. **Mamão: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. v. 11, p. 9-11.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, IRRIGAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA. **Cultura: mamão**. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br>>. Acesso em: 3 jul. 2008.

SHOLBERG, P. L.; SHEPHARD, T.; RANDALL, P.; MOYLS, L. Use of measured concentrations of acetic acid vapour to control postharvest decay in d'Anjou pears. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 89-98, 2004.

SILVA, I. D. da; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R. da; CUNHA, M. G. da. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SIQUEIRA, T. V. de. A cultura do mamão: desempenho no período 1961-2002. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 91-148, set. 2003.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum* biology, pathology, and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

TATAGIBA, J. S.; LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 186-192, 2002.

TODA FRUTA. **Pós colheita de mamão**. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em: 3 jul. 2008.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo de doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F. S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro**: tecnologias de produção. Vitória: Incaper, 2003. p. 229-307.

CAPÍTULO 1

Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão

**Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de
mamão**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Pesquisa Agropecuária
Brasileira”)

Lahyre Izaete Silveira Gomes ⁽¹⁾, Eduardo Alves ⁽¹⁾, Enilton Nascimento de Santana ⁽²⁾ e Hilário Antônio de Castro ⁽¹⁾. ⁽¹⁾Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil; ⁽²⁾Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rodovia BR 101 Norte- Km 151- Cx. Postal 62- 29900-970, Linhares, ES, Brasil.

Autor para correspondência: e-mail:lahyreizaete@yahoo.com.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um método simples e seguro de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão combinado com o estágio de maturação do fruto para reproduzir de modo uniforme os sintomas de antracnose em laboratório. Frutos da cultivar 'Golden' nos estádios de maturação 1, 2 e 3 foram inoculados com uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides* por dois métodos (método 1 - cinco ferimentos feito com uma agulha de metal; método 2 - 22 ferimentos feito com conjunto de agulhas entomológicas). Os frutos foram submetidos à câmara úmida por 48 horas, sendo armazenados à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação do ensaio foi realizada aos 5 dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro das lesões de antracnose. Os estádios de maturação 2 e 3 associados ao método 1 mostraram-se eficientes na reprodução de sintomas de antracnose em condição de laboratório.

Palavras-chave: antracnose, *Carica papaya*, doenças pós-colheita, sintomas, estágio de maturação.

Abstract

This work had as objective establishes a simple and precise method of inoculation of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya fruits combined with the stadium of maturation of the fruit to develop a repetitive way to reproduce anthracnose symptoms in laboratory. Fruits of cultivar 'Golden' in the stadiums of maturation 1 (with up to 15% of the yellowing skin), 2 (with up to 25% of the yellowing skin) and 3 (with up to 50% of the yellowing skin) maturation stages were wounded in two ways with needle number 6 (method 1- five wounds done with a needle) and entomologic needle number 7 (method 2- 22 wounds done with group of entomologic needles) and inoculated with a suspension of $2,5 \times 10^6$ conidia/mL of *C. gloeosporioides*. The fruits were submitted to the moist camera by 48 hours, being stored to the temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The evaluation was accomplished to the 5 days after the inoculation, where the diameter of the anthracnose lesions was measured. The fruit ripeness stadium 2 and 3 associated to the method 1 were more efficient in the reproduction of anthracnose symptoms in laboratory conditions.

Keywords: anthracnose, *Carica papaya*, postharvest diseases, symptoms, stages of maturation.

INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas no mundo, especialmente nas áreas tropicais (Simão, 1998). O Brasil é o maior produtor mundial, com uma produção de 1.573.819 toneladas em 2006, com a maior parte da produção concentrada nos estados do Espírito Santo e Bahia (Agriannual, 2008).

Antracnose, mancha-chocolate, podridão de *Lasiodiplodia*, podridão de *Rhizopus*, podridão de *Fusarium*, podridão de *Phomopsis*, podridão de *Alternaria* e podridão de *Stemphylium* estão entre as principais doenças em pós-colheita causadas por fungos em frutos de mamão (Liberato & Zambolim, 2002).

A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é considerada a principal doença em frutos de mamão. Estes quando afetados tornam-se inviáveis para a comercialização e consumo e, mesmo que os sintomas não sejam diagnosticados no campo, eles podem aparecer na fase de amadurecimento, transporte, embalagem e comercialização (Oliveira & Filho, 2000). Os sintomas iniciam-se com pequenas manchas rosadas sobre a superfície dos frutos em maturação. Com o desenvolvimento da doença, essas lesões tornam-se arredondadas e aumentam de tamanho, sendo formadas lesões deprimidas e circulares de cor escura, que atingem até 5 cm de diâmetro, por 3 a 5 mm de profundidade. Quando numerosas, podem coalescer e afetar todo o fruto. A frutificação do fungo concentra-se na parte central da lesão e toma um aspecto gelatinoso de coloração rósea (Oliveira & Santos Filho, 2000; Liberato & Zambolim, 2002).

Na literatura recomenda-se que o controle da doença seja iniciado no campo, realizando pulverizações durante o período de frutificação, atingido

flores, frutos novos e, seguido de cuidados essenciais e preventivos, na colheita e na pós-colheita. O tratamento pós-colheita dos frutos é uma forma de controlar o micélio quiescente do fungo, além de proteger os frutos de infecções secundárias, durante o armazenamento e transporte para os mercados consumidores. Na pós-colheita, tem sido utilizado o controle hidrotérmico combinado com o controle químico (Ventura et al., 2003).

Vários estudos citam diferentes metodologias de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão, mas nenhum correlaciona com o estágio de maturação (Nery-Silva et al., 2001, 2007; Marques et al., 2003; Andrade et al., 2007; Garcia et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi buscar um método simples e seguro de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão associado a um estágio de maturação do fruto, para que os sintomas de antracnose sejam reproduzidos de modo uniforme em laboratório. Com isso, os estudos de controle da doença serão facilitados.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), em Linhares, Espírito Santo.

O isolado foi obtido de fruto de mamão com lesão de antracnose vendido em uma feira de Lavras, Minas Gerais. Foi feito o isolamento direto do fungo presente nas lesões dos frutos, o qual foi transferido para placas de Petri, contendo o meio BDA (batata, dextrose e ágar). A cultura foi incubada em câmara de crescimento, ajustada a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Frutos da cultivar 'Golden', provenientes do pomar comercial da empresa Caliman situada em Linhares, ES, foram colhidos e transportados para o laboratório da Caliman, onde foram selecionados quanto ao tamanho, estágio de maturação e ausência de defeitos e, em seguida foram desinfestados com solução de ácido peracético a 0,02% e enxaguados com água destilada. Posteriormente, os frutos foram embalados e transportados para o laboratório do Incaper onde o experimento foi conduzido.

Os estádios de maturação escolhidos para os testes foram: estágio 1 – frutos com até 15% da casca amarela; estágio 2 - frutos com até 25 % da casca amarela; e estágio 3 - frutos com até 50% da casca amarela. Frutos nos três estádios de maturação foram submetidos a dois métodos de inoculação: método 1 - foram feitos cinco ferimentos com uma agulha de metal nº 6; e método 2 – foram feitos ferimentos simultaneamente com um conjunto de 22 agulhas entomológicas tamanho 7 (Figura 1). O látex que saiu dos ferimentos dos frutos foi retirado com algodão. Sobre os ferimentos foi feita a deposição de 15 µL de uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides*.

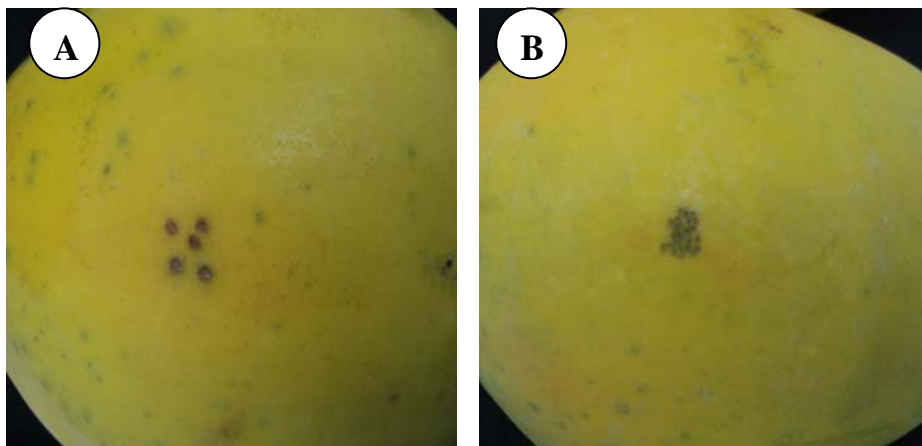


Figura 1 - Frutos de mamão ‘Golden’ com 5 ferimentos feitos com agulha de metal n° 6 (A), ferimentos feitos simultaneamente com conjunto de 22 agulhas entomológicas tamanho 7 (B). UFLA, Lavras-MG, 2008.

Realizada a inoculação, os frutos foram submetidos à câmara úmida, utilizando sacos plásticos. Em cada saco foi colocado um pedaço de algodão umedecido com água destilada esterilizada. A câmara úmida foi desfeita após 48 horas da inoculação, sendo os frutos armazenados à temperatura de 25 ± 2 °C. A avaliação do ensaio foi realizada aos 5 dias de inoculação, onde foi medido o diâmetro das lesões de antracnose utilizando um paquímetro.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 12 repetições por tratamento, sendo o experimento analisado em esquema fatorial, 3×2 , com 3 estádios de maturação e 2 métodos de inoculação. O experimento foi repetido para confirmar os resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos no estágio de maturação 1 e 2 quando inoculados pelo método de inoculação 2, não mostraram sintomas evidentes de antracnose. No entanto, os frutos no estágio de maturação 2 que foram inoculados com o método 1 apresentaram sintomas bem mais evidentes do que os frutos no estágio de maturação 1 (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias dos diâmetros das lesões de antracnose em frutos de mamão, resultantes da inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos em diferentes estádios de maturação, utilizando duas metodologias de inoculação. UFLA, Lavras-MG, 2008.

Estádio de maturação	Metodologia de inoculação	Média do diâmetro da lesão (cm)
1	1	0,35 ab
	2	0,04 a
2	1	1,24 cd
	2	0,30 ab
3	1	1,71d
	2	0,78 bc

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valor do Coeficiente de Variação = 68%.

Os frutos no estágio de maturação 2 e 3, que foram inoculados pelo método 1, apresentaram sintomas de antracnose mais evidentes do que os frutos que foram inoculados sobre os ferimentos feitos com o conjunto de agulhas entomológicas (Figura 2).

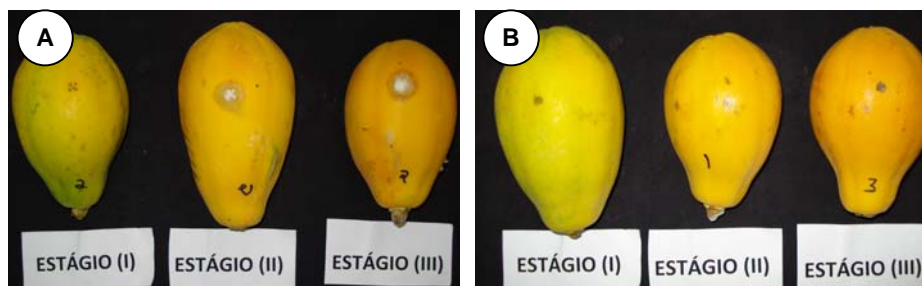


Figura 2 - Frutos de mamão ‘Golden’ em diferentes estádios de maturação com ferimentos feitos com agulha de metal n° 6 (A), e com conjunto de agulhas entomológicas tamanho 7 (B), após 5 dias de inoculação com *C. gloeosporioides*. UFLA, Lavras-MG, 2008.

Em relação aos instrumentos utilizados para ferir os frutos de mamão, o que possibilitou maiores lesões de antracnose foi a agulha de metal n°6, em comparação com o conjunto agulhas entomológicas. Acredita-se, que o que deve ter sido responsável pela eficiência da inoculação foi o diâmetro maior das lesões feitas pelo método 1, promovendo assim uma melhor condição para que o fungo *C. gloeosporioides* penetrasse e se desenvolvesse nos frutos de mamão. Trabalho semelhante a este foi desenvolvido por Nery-Silva et al. (2007), que estabeleceram uma metodologia para a inoculação de agentes causais da podridão peduncular em frutos de mamão, o qual consiste na deposição de gotas de suspensão de conídios na região próxima ao pedúnculo, seguida de ferimento por agulha hipodérmica.

Diante dos resultados, verifica-se que o melhor estágio de maturação para a inoculação de *C. gloeosporioides* e reprodução de sintomas de antracnose em frutos de mamão é o estágio de maturação 3.

O fungo penetra no fruto imaturo e emite uma hifa subcuticular, entretanto o fungo não desenvolve devido às condições fisiológicas do fruto (Dickman & Alvarez, 1983). Almeida et al. (2006) evidenciaram o aumento de

sólidos solúveis totais em frutos de mamão no decorrer do amadurecimento. Portanto, pode-se inferir que devido ao fruto estar mais maduro e possuir um maior teor de açúcares, estes ficam disponíveis para o fungo permitindo seu desenvolvimento. Além disso, os frutos mais maduros possuem uma menor quantidade de papaína, que é uma proteína enzimática proteolítica encontrada no látex de frutos verdes de mamão (Melo et al., 1997) que pode estar associada ao impedimento da germinação e colonização do fungo. Segundo Fosket (1994), a expressão de inibidores de proteases em vegetais representa um mecanismo de defesa contra o ataque de diversos patógenos, como fungos, vírus e insetos herbívoros. Lorito et al. (1994), mostraram que inibidores de protease vegetais suprimem a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Botrytis cinerea*.

Entretanto para fazer testes de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão e simular as condições reais de tratamento dos frutos, é mais interessante utilizar frutos no estágio de maturação 2, isto porque os frutos no estágio de maturação 2 ou menor que este, são enviados para exportação (Martins, 2000).

CONCLUSÕES

Os estádios de maturação 2 e 3 associado a metodologia 1 (cinco ferimentos feitos com agulha de metal nº 6) mostraram-se eficientes na reprodução de sintomas de antracnose em condição de laboratório, e podem ser recomendadas para a realização de futuros trabalhos que tenham por objetivo inocular *C. gloeosporioides* em frutos de mamão.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (Incaper) pelo apoio referente ao transporte e disponibilização de seus funcionários para a realização deste trabalho e à Empresa Caliman Agrícola, pelo fornecimento dos frutos de mamão. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos do primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – Agriannual. **Mamão**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008.

ALMEIDA, R. F. de; MARTINS, M. L. L.; RESENDE, E. D. de; VITORAZI, L.; CARLOS, L. de A.; PINTO, L. K. de A. Influência da temperatura de refrigeração sobre as características químicas do mamão cv. “Golden”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 577-581, jul./set. 2006.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, p. 748-750, 1983.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic, 1994. 508 p.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIÉGAS-AQUIJE, G. M. F.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 163-168, 2008.

LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em mamoeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 1023-1170.

LORITO, M.; BRODWAY, M.; HAYES, C. K.; WOO, S. L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D. L.; HARMAN, G. E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 525-527, 1994.

MARQUES, S. S.; SANTOS, M. P.; ALVES, E. S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de mamoeiro. In: PAPAYA BRASIL. **Qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 591-594.

MARTINS, D. S. Exportação de mamão 'Solo' para os Estados Unidos: procedimentos. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. da S. (Org.). **Frutas do Brasil: mamão fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. v. 11, p. 15-22.

MELO, W. J. de; MELO, G. M. P. de; MELO, V. P. de. **Papaína**: uma opção para o produtor de mamão. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 75 p.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O.; RESENDE, M. L. V. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, 2001.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, L. C. O. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1374-1379, 2007.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO. Doenças do mamoeiro. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Org.). **Mamão: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. v. 11, p. 37-46.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo de doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F. S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, 2003. p. 229-307.

CAPÍTULO 2

Efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro

Efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro

(Preparado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology”)

**Lahyre Izaete S. Gomes¹, Eduardo Alves¹, Enilton Nascimento de Santana²,
Eudes de Arruda Carvalho¹ & Hilário Antônio de Castro¹.**

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil; ²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rodovia BR 101 Norte- Km 151- Cx. Postal 62- 29900-970, Linhares, ES, Brasil. E-mail:lahyreizaete@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) pelos métodos de fumigação e contato sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e pelos métodos de fumigação e de contato (imersão) sobre a intensidade da antracnose em frutos de mamão. Para testar a eficiência dos óleos essenciais *in vitro* pelo método de fumigação foi utilizado o meio de cultura BDA, o qual foi transferido para placas de Petri nas quais foram adicionados discos retirados de colônias do fungo e colocados no centro das placas. Alíquotas dos óleos foram aplicadas com micropipeta automática na superfície do papel filtro, sendo este fixado na tampa da placa de Petri de forma que as concentrações finais foram de 50, 100, 200 e 400 ppm. Para avaliar o método de contato, foi utilizado o meio de cultura BDA, no qual foram adicionados os óleos essenciais originando as concentrações finais de 75, 150, 300 e 600 ppm. No teste *in vivo*, frutos de mamão foram feridos e posteriormente inoculados com 15 µL de uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL do fungo. Em seguida, os frutos foram armazenados em caixas que foram fechadas com sacos plásticos por um período de 12 horas, onde foram expostos as concentrações de 50, 100 e 200 ppm dos óleos essenciais depositados em papel filtro dentro de pequenos recipientes. Para o método de imersão os frutos depois de 12 horas de inoculados foram submetidos aos tratamentos com os mesmos óleos essenciais nas concentrações de 75, 150 e 300 ppm, água destilada esterilizada, leite em pó a 2% e fungicida Tecto SC (Thiabendazol) na concentração de 350 ppm, pela imersão durante 1 minuto. Após os tratamentos, os frutos permaneceram na condição ambiente 23 a 27 °C pelo período de 7 dias. Dos óleos essenciais utilizados *in vitro*, o que proporcionou a maior redução do crescimento micelial do fungo, por contato, foi o óleo de cravo. No método de fumigação os óleos essenciais, exceto o de capim-limão na menor concentração inibiram por completo o crescimento do fungo. No teste *in vivo* o óleo essencial de cravo mostrou-se promissor para o controle da doença nos frutos pelo método de imersão.

Termos para indexação: *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Colletotrichum gloeosporioides*, fumigação, imersão.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and thyme (*Thymus vulgaris*) applied to papaya fruits through the fumigation and contact methods on the micelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and fumigation and contact methods (immersion) on the intensity of the anthracnose in papaya fruits. To test the efficiency of the essential oils *in vitro* by the fumigation method, it was used the PDA culture medium, which was transferred to Petri dishes in which agar plugs were removed from the fungal colony and transferred to the center of the plates. Different oil concentrations were applied with automatic micropipete on the surface of filter paper, which was fixed on the cover of the Petri plate giving final concentrations of 50, 100, 200 and 400 ppm. To evaluate the contact method, the PDA culture medium was used, in which was added the essential oils at final concentrations of 75, 150, 300 and 600 ppm. In the *in vivo* test, papaya fruits were wounded and subsequently inoculated with 15 μ L of a conidial suspension containing 2.5×10^6 conidia/mL. Then the fruits were stored in boxes that were enclosed by plastic bags for a period of 12 hours, where they were exposed to the concentrations of 50, 100 and 200 ppm of the essential oils embedded in filter paper inside small containers. For the immersion treatment the fruits, 12 hours after inoculation, were submitted to treatments with the same essential oils in the concentrations of 75, 150 and 300 ppm, sterile distilled water, 2% powder milk, and the fungicide Tecto SC (Thiabendazol) in the concentration of 350 ppm, by the immersion for 1 minute. After the treatments the fruits were kept at room conditions 23 to 27 °C for 7 days. From the essential oils analyzed *in vitro*, the clove oil had the best effect on the reduction of the micelial growth of the fungus, by contact. For the fumigation method all of the essential oils, except for the lemongrass in the lowest concentration inhibited totally the growth of the fungus. In the *in vivo* test the clove essential oil showed to be promising for the control of the disease on the papaya fruits by the immersion method.

Index terms: *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Colletotrichum gloeosporioides*, fumigation, immersion.

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é a doença mais importante em frutos de mamão. Os frutos atacados tornam-se imprestáveis para a comercialização e consumo. Ainda que estes não apresentem os sintomas nas condições de campo, a doença se manifesta mais tarde na fase de embalagem, transporte, amadurecimento e comercialização, causando grandes perdas (Oliveira & Santos Filho, 2000). Para o controle da doença pós-colheita utiliza-se o tratamento hidrotérmico e fungicidas químicos (Ventura et al., 2003).

Com restrição ao uso de fungicidas devido a seleção do patógeno, a fitotoxicidade e aos efeitos residuais que causam danos ao ambiente e à saúde humana, tem se testado medidas alternativas de controle tais como o uso de produtos naturais eficientes e de baixo impacto ambiental. Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (Moreira et al., 2002).

Atualmente uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de óleos essenciais, que de forma geral são substâncias orgânicas voláteis, extraídas de plantas as quais são muito conhecidas pelo aroma (Martins et al., 2000). A literatura tem registrado a eficiência de óleos essenciais, obtidos de uma gama enorme de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos em frutos na pós-colheita (Marques et al., 2003; Lee et al., 2007; Garcia et al., 2008; Tripathi et al., 2008).

Tendo em vista a eficiência dos óleos essenciais sobre os agentes fitopatogênicos, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) pelo método de fumigação e de contato

sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e pelo método de fumigação e de contato (imersão) sobre a intensidade da antracnose em frutos de mamão.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do isolado

O isolado foi obtido de fruto de mamão com lesão de antracnose vendido em uma feira de Lavras, Minas Gerais. O fungo foi isolado em placas de Petri, contendo o meio BDA (batata, dextrose e ágar). As placas foram incubadas em câmara de crescimento ajustadas à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz branca fluorescente e 12 h de escuro.

2.2 Obtenção dos óleos

Os óleos essenciais foram obtidos de uma indústria que comercializa óleos em fracos de 10 mL situada em Piracicaba-SP.

2.3 Teste *in vitro*

Para avaliação dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial do patógeno pelo método de contato, foi utilizado o meio de cultura BDA no qual foi adicionado os óleos essenciais que primeiramente foram diluídos em uma solução de água mais leite em pó (emulsificante natural) a 2% para melhor incorporação ao meio de cultura, originando as concentrações finais de 75, 150, 300 e 600 ppm. Tal solução (meio + óleo + leite em pó) foi transferida para placas de Petri de 9 cm de diâmetro (15 mL/placa). Discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados de colônias do fungo após 8 dias de incubação, e colocados no centro das placas. A testemunha constituiu-se apenas de BDA. As placas foram incubadas em câmara de crescimento ajustada a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz branca fluorescente e 12 h de escuro. Após 2, 4,

6, 8 e 10 dias de incubação foi medido o diâmetro da colônia em dois sentidos, perpendicularmente, e posteriormente foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições em arranjo no esquema fatorial $(3 \times 4) + 2$, sendo 3 óleos (cravo, capim-limão e tomilho), 4 concentrações (75, 150, 300 e 600 ppm) mais dois tratamentos adicionais, a testemunha e o fungicida (Tecto®).

Para avaliação dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial do fungo pelo método de fumigação, foi utilizado o meio de cultura BDA, o qual foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (15 mL/placa). Discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados de colônias do fungo após 8 dias de incubação, e colocados no centro das placas. Aliquotas dos óleos essenciais foram aplicadas com micropipeta automática na superfície de papel filtro, o qual foi fixado utilizando fita dupla-face na tampa da placa de Petri de forma que as concentrações finais foram de 50, 100, 200 e 400 ppm em relação ao volume da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento ajustada a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz branca fluorescente e 12 h de escuro. Após 2, 4, 6, 8 e 10 dias da incubação foi medido o diâmetro da colônia em dois sentidos, perpendicularmente, para posteriormente calcular o IVCM. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições e analisado em arranjo no esquema fatorial $(3 \times 4) + 1$, sendo 3 óleos essenciais (cravo, capim-limão e tomilho), 4 concentrações (50, 100, 200 e 400 ppm) mais um tratamento adicional, a testemunha, para a qual o papel filtro recebeu água destilada.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela seguinte equação, proposta por Oliveira (1991).

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior

N = número de dias após a inoculação

As análises estatísticas foram realizadas no programa SISVAR (Ferreira, 2000).

2.4 Teste *in vivo*

Mamões da cultivar ‘Golden’, provenientes do pomar comercial da empresa Caliman situada em Linhares, Espírito Santo, foram colhidos e transportados para o laboratório da Caliman, onde foram selecionados quanto ao tamanho, estágio de maturação 2 (com até 25 % da casca amarela) e ausência de defeitos e, em seguida foram desinfestados em solução de ácido peracético a 0,02 % e enxaguados com água destilada. Os frutos selecionados receberam 5 ferimentos feitos com agulha de metal nº 6, o látex que saiu dos ferimentos dos frutos foi retirado com algodão. Posteriormente os frutos foram inoculados com 15 µl de uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides*.

O tratamento dos frutos de mamão com óleos essenciais pelo método de contato foi feito de forma que 12 horas após a inoculação dos frutos, os quais foram mantidos em câmara úmida, procedeu-se os tratamentos com os óleos essenciais de capim limão, cravo e tomilho nas concentrações de 75, 150 e 300 ppm, leite em pó a 2% e fungicida Tecto SC® (Thiabendazol) na concentração de 350 ppm, pela imersão durante 1 minuto. Após os tratamentos, os frutos

permaneceram na condição ambiente (23 a 27 °C e 75 a 85% UR) pelo período de 7 dias.

Para o tratamento dos frutos de mamão com óleos essenciais pelo método de fumigação, os frutos inoculados foram armazenados em caixas de papel de 6,5 litros e postos em câmara úmida. As caixas foram fechadas com sacos plásticos por um período de 12 horas, onde foram expostos a três concentrações dos óleos essenciais de capim limão, cravo, e tomilho, depositados em papel filtro dentro de pequenos recipientes. Utilizaram-se as concentrações de 50, 100 e 200 ppm. Os frutos testemunha não foram expostos aos óleos voláteis.

As avaliações foram feitas medindo-se o diâmetro das lesões nos frutos com paquímetro, aos 4 e 6 dias após os tratamentos com os óleos essenciais. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em parcela subdividida no tempo, com 4 repetições contendo 3 frutos como unidade experimental.

RESULTADOS

3.1 Efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos no método de contato. O crescimento micelial de *C. gloeosporioides* foi reduzido com o aumento das concentrações do óleo essencial de Capim-limão. Os óleos essenciais de Cravo e de Tomilho inibiram completamente o crescimento do fungo em concentrações superiores a 300 ppm (Figura 1).

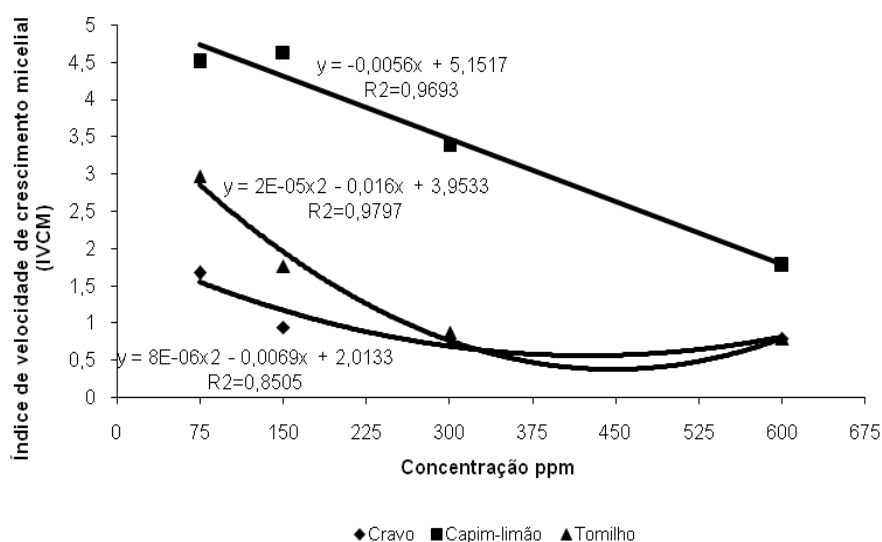


Figura 1- Efeito *in vitro* de concentrações de óleos essenciais, medido pelo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo. Concentrações: 75; 150; 300 e 600 ppm. Método de contato. UFLA, Lavras-MG, 2008.

Verificou-se que o IVCM do fungo para todos os tratamentos, ou seja, todos os óleos essenciais em todas as concentrações, exceto para o óleo de

capim-limão na concentração de 150 ppm, apresentou diferença significativa em relação à testemunha, que teve maior IVCM (Figura 2B). O IVCM do fungo em contato com o fungicida quando comparado ao IVCM do fungo em contato com o óleo essencial de cravo na concentração de 75 ppm, ao óleo de capim-limão na concentração de 600 ppm e ao óleo de tomilho na concentração de 150 ppm, não diferiram entre si. O óleo essencial de cravo nas concentrações de 150, 300 e 600 ppm propiciou maior inibição do crescimento micelial do que o fungicida utilizado, o mesmo aconteceu com o óleo de tomilho nas concentrações de 300 e 600 ppm (Figura 2C).

O óleo essencial do capim-limão foi o menos efetivo na inibição do crescimento micelial quando comparado com o fungicida e com a testemunha.

Pelo método de fumigação os óleos essenciais em todas as concentrações inibiram o crescimento total do fungo, exceto o óleo de capim-limão na concentração de 50 ppm. O IVCM do *C. gloeosporioides* em todos os tratamentos pelo método de fumigação diferiu estatisticamente da testemunha, que teve maior ICVM (Figura 2A).

Dos óleos essenciais utilizados *in vitro*, o que apresentou maior redução no crescimento micelial do fungo por contato foi o óleo de cravo.

No ensaio *in vitro* o método de fumigação foi mais eficiente na inibição de *C. gloeosporioides* do que o método de contato, apesar da fumigação utilizar doses menores do que o método de contato.

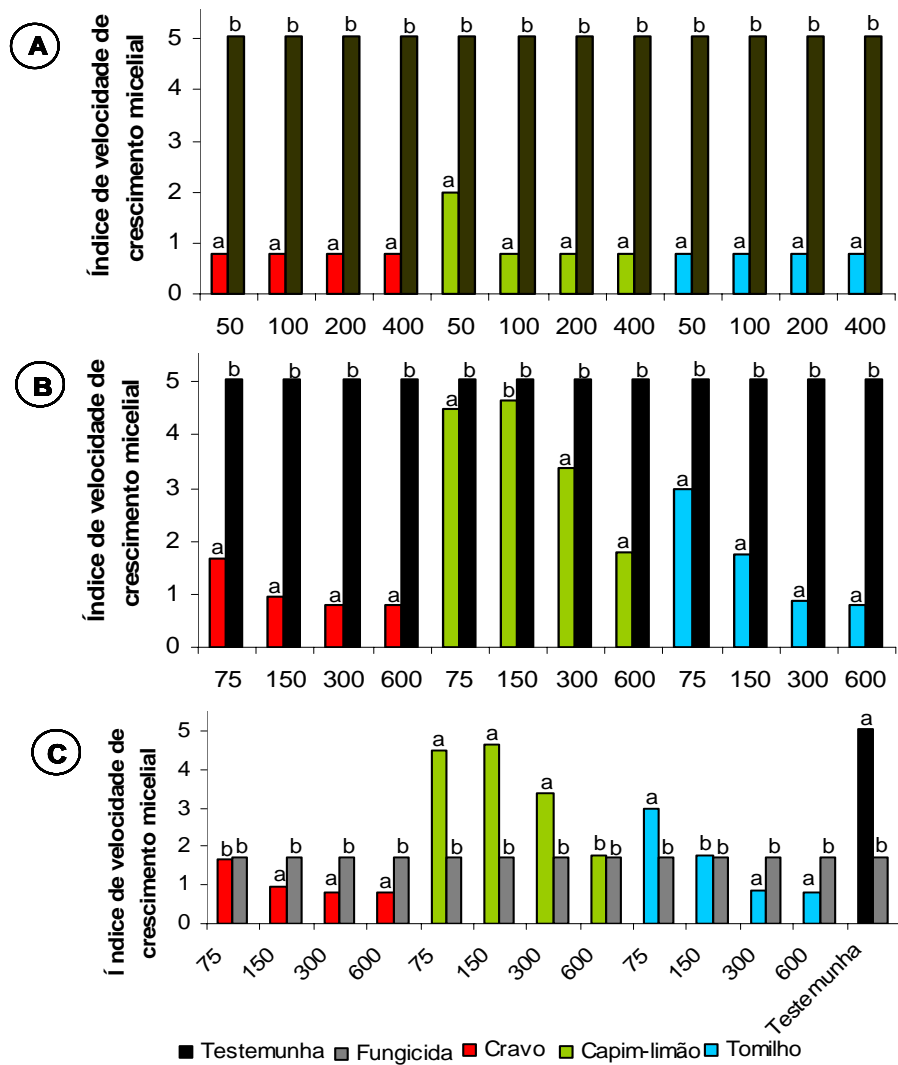


Figura 2- Contraste das médias do IVCM de *C. gloeosporioides* em BDA entre os 3 óleos nas 4 concentrações (ppm) e a testemunha (água) por fumigação (A); entre os 3 óleos nas 4 dosagens e a testemunha (BDA) por contato (B); entre os 3 óleos nas 4 dosagens e o fungicida Tecto® por contato (C) UFLA, Lavras-MG, 2008.

3.2 Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose em frutos de mamão

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O óleo essencial de cravo e de tomilho na concentração de 300 ppm apresentaram melhor controle sobre as lesões de antracnose do que os outros tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro médio (cm) das lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais em diferentes concentrações pelo método de contato (imersão) a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.

	Concentração (ppm)		
	75	150	300
Óleos Essenciais			
Óleo de cravo	1,59 bA	1,58 bA	1,37 aA
Óleo de capim-limão	2,03 abC	1,91 aC	2,07 bB
Óleo de tomilho	1,79 bB	1,74 bB	1,50 aA

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valor do Coeficiente de variação = 7,33%.

Pela figura 3B, pode-se observar que dos óleos essenciais utilizados pelo método de contato (imersão), o único que teve efeito sobre as lesões de antracnose quando comparado com a testemunha e ao fungicida foi o óleo de cravo na concentração de 300 ppm. Os demais óleos não reduziram o diâmetro da lesão sobre os frutos de mamão em comparação a testemunha, exceto o óleo de tomilho na concentração de 300 ppm que não diferenciou da testemunha.

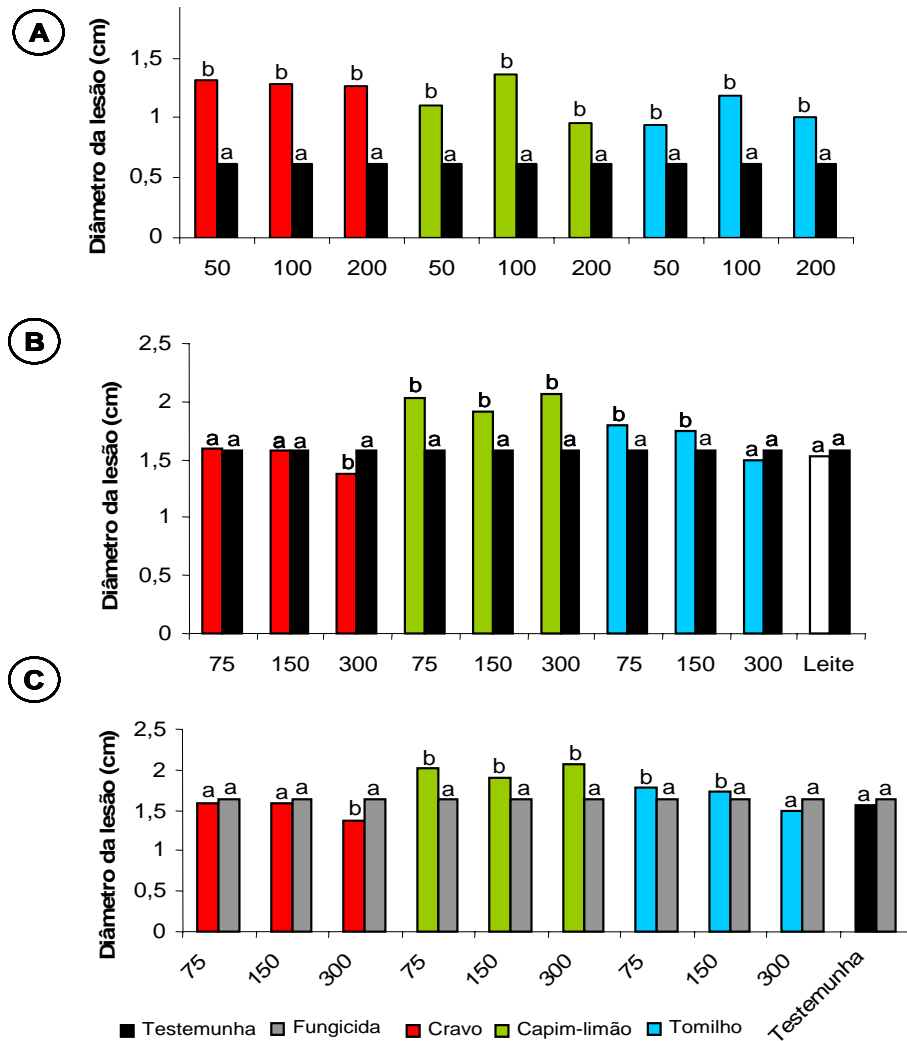


Figura 3- Contraste das médias do diâmetro das lesões de antracnose em frutos de mamão entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e a testemunha pelo método de fumigação (A); entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e a testemunha pelo método de imersão (B); entre os 3 óleos essenciais nas 3 concentrações e o fungicida (Tecto) pelo método de imersão (C). UFLA, Lavras-MG, 2008.

Não houve diferença significativa entre o diâmetro da lesão dos frutos não tratados e o diâmetro dos frutos que foram tratados com fungicida e dos frutos que foram imersos na solução de leite em pó (Figura 3C).

Quatro dias após o tratamento dos frutos com os óleos essenciais, o diâmetro da lesão dos frutos tratados com os óleos essenciais de cravo e de tomilho não diferiram entre si, sendo que estes tiveram melhor efeito sobre a doença do que o óleo de capim-limão. Entretanto aos seis dias após o tratamento, o óleo essencial de cravo mostrou-se mais eficiente do que os demais (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais em diferentes tempos pelo método de contato (imersão) a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.

Tempo em dias	Óleos Essenciais		
	Cravo	Capim-limão	Tomilho
4	0,54 aA	0,75 bA	0,61 aA
6	2,49 aB	2,75 bB	3,25 cB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valor do Coeficiente de variação = 7,33%

No método de fumigação, pode-se observar que não houve diferença estatística entre as diferentes doses do óleo essencial de cravo usadas para o controle da antracnose nos frutos de mamão (Tabela 3). Em relação aos óleos de capim-limão e tomilho não houve um padrão de redução do diâmetro da lesão em relação às concentrações.

Observou-se diferença significativa quando se compara o diâmetro das lesões dos frutos testemunhas com o diâmetro das lesões dos frutos tratados com

os óleos essenciais por meio de fumigação, de forma que o diâmetro da lesão da testemunha foi menor em todos os contrastes (Figura 3A).

Tabela 3. Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais pelo método de fumigação em diferentes concentrações a temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.

	Concentração (ppm)		
	50	100	200
Óleos Essenciais			
Óleo de cravo	1,32 aB	1,28 aA	1,27 aB
Óleo de capim-limão	1,11 aAB	1,37 bA	0,96 aA
Óleo de tomilho	0,94 aA	1,19 bA	1,00 abA

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valor do Coeficiente de variação = 14,31%.

Quatro dias após o tratamento dos frutos não houve diferença estatística entre óleos essenciais utilizados quando se refere ao diâmetro das lesões. Entretanto, no sexto dia de avaliação, o óleo essencial de tomilho reduziu o desenvolvimento das lesões de antracnose nos frutos em relação aos demais óleos (Tabela 4).

Tabela 4. Diâmetro médio (cm) de lesões de antracnose em frutos de mamoeiro tratados com óleos essenciais pelo método de fumigação avaliados em dois tempos à temperatura ambiente (25 °C). UFLA, Lavras-MG, 2008.

Tempo em dias	Óleos Essenciais		
	Cravo	Capim-limão	Tomilho
4	0,42 aA	0,36 aA	0,31 aA
6	2,16 cB	1,94 bB	1,78 aB

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valor do Coeficiente de variação = 14,31%.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, sobre a inibição do crescimento fúngico pelos óleos essenciais em contato com o meio de cultura são semelhantes aos observados em vários estudos já realizados. Como exemplo, pode-se citar o trabalho realizado por Guimarães et al. (2007), onde avaliaram o efeito *in vitro* do óleo essencial de capim-limão sobre o fungo *C. gloeosporioides* e observaram que este foi totalmente inibido na concentração de 500 ppm. O óleo essencial de cravo inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* quando aplicado em 30 µL por placa (Rozwalka et al., 2008). Na concentração de 600 ppm este mesmo óleo inibiu o desenvolvimento total dos fungos *Aspergillus niger*, *Eurotium repens* e *Rhizopus* sp (Souza et al., 2004). Tripathi et al. (2008), relataram que óleo essencial de cravo inibiu em 100% o crescimento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea* na concentração de 500 ppm.

Os resultados obtidos em relação à inibição do fungo pelos óleos essenciais no método de fumigação neste experimento assemelham-se com trabalho realizado por Lee et al. (2007), quando relataram a inibição 60 % para *C. gloeosporioides*, 76 % para *Fusarium oxysporum* e 50% *Rizoctonia solani*, quando utilizou o óleo essencial de tomilho por meio de fumigação. Pimentel (2007), utilizando o óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*, verificou a inibição total *in vitro* do crescimento micelial de *Aspergillus flavus* na dose de 1µL/mL utilizando o mesmo método.

Quando se compara o IVCM do fungo entre a testemunha e os óleos essenciais nas suas respectivas concentrações no método de fumigação, observa-se que os IVCMs do fungo submetido aos tratamentos com todos os óleos foram

menores do que o da testemunha, indicando um eficiente poder destes óleos na inibição do *C. gloeosporioides* pelo método utilizado (Figura 2).

Considerando-se os bons resultados referentes à inibição do desenvolvimento micelial do fungo *C. gloeosporioides* pelos óleos essenciais de cravo, capim-limão e tomilho *in vitro*, nas duas formas de controle, pode-se confirmar a sua eficiência fungicida e fungistática, que se deve principalmente aos constituintes que são encontrados nestes óleos (Singh et al.,1993).

Quando os frutos foram tratados com os óleos pelo método de contato (imersão) e deixados à temperatura ambiente, o único óleo que se mostrou eficiente para o controle da antracnose quando comparado com a testemunha foi o de cravo na concentração de 300 ppm. O mesmo óleo foi o mais efetivo contra o crescimento micelial *in vitro* pelo método de contato. Garcia et al. (2008) trataram frutos de mamão pela imersão em formulado a base de monoterpene citral a 1%, obtido do óleo essencial de capim-limão e obteve 70 % de redução do diâmetro da lesão quando comparado com a testemunha. O óleo essencial de capim-limão a 1,5% inibiu em 19,9% o crescimento de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão (Marques et al., 2004).

O fungicida utilizado como testemunha, apresentou baixa eficiência no controle do fungo *C. gloeosporioides*, não diferindo estatisticamente dos óleos essenciais em algumas concentrações. E isso se deve provavelmente ao uso contínuo deste fungicida pelos produtores para o controle da doença. Resultados semelhantes foram observados em trabalho realizado por Liberato & Tatagiba (2001), o qual revelou a ineficiência dos benzimidazóis aplicados em pós-colheita. Tavares & Souza (2005) utilizaram os fungicidas do grupo dos benzimidazóis (tiofanato metílico e thiabendazole) no controle micelial do *C. gloeosporioides*, e estes se mostraram ineficientes na inibição da germinação dos esporos do fungo.

No tratamento dos frutos pelo método de fumigação, deixados sob temperatura ambiente, o óleo mais eficiente em relação aos demais foi o de tomilho. Assim nota-se que este óleo essencial tem um efeito mais duradouro na inibição do crescimento do fungo do que o óleo de capim-limão e cravo quando usado por meio de fumigação. Desta forma, o óleo essencial de tomilho em concentrações maiores talvez seja uma opção viável ou complementar ao tratamento pós-colheita para o controle da antracnose em frutos de mamão. Entretanto, em relação à testemunha, estes óleos pelo método de fumigação não mostraram resultados satisfatórios no controle do fungo sobre os frutos como ocorreu *in vitro*. Por outro lado, resultados positivos quanto ao poder antifúngico de óleos essenciais em pós-colheita de frutos pelo método de fumigação já foram relatados. Por exemplo, Tripathi et al. (2008) observaram que uvas tratadas com o óleo essencial de cravo, na concentração de 100 ppm, por meio de fumigação, ficaram mais tempo armazenadas em prateleira resistindo contra a podridão causada por *Botrytis cinerea*. Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e de *Cuminum cyminum* suprimiram o desenvolvimento em 59 e 37% nas concentrações de 8 e 10 μl^{-1} respectivamente de lesões causadas por *Botrytis* sp. em frutos de maçã, usando o método de fumigação (Lee et al., 2007).

Neste estudo observou-se que os frutos submetidos aos tratamentos com os óleos essenciais amadureceram mais rápido do que os frutos que não foram submetidos a nenhum tratamento, isso provavelmente está associado ao poder que os óleos essenciais têm em acelerar a maturação dos frutos. Isto pode explicar o maior diâmetro das lesões de antracnose nos frutos tratados com os óleos em relação à testemunha, já que, com o amadurecimento o teor de compostos inibidores de microrganismos nos frutos decresce.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (Incaper) pelo apoio referente ao transporte e disponibilização de seus funcionários para a realização deste trabalho e à Empresa Caliman Agrícola, pelo fornecimento dos frutos de mamão. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos do primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIÉGAS-AQUIJE, G. M. F.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 163-168, 2008.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LEE, S. L.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; LIM, H. K.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Honolulu, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LIBERATO, J. R.; TATAGIBA, J. S. Avaliação de fungicidas *in vitro* e em pós-colheita para o controle da antracnose e da podridão em frutos de mamão. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 409-414, out./dez. 2001.

MARQUES, S. S.; SANTOS, M. P.; ALVES, E. S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de mamoeiro. In: _____. **Papaya Brasil**. Vitória, [s.n.], 2003. p. 591-593.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220 p.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L.; ALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; LIMA, M. L. R. Z.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós-colheita de *Monilia Fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 395-398, 2002.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO. Doenças do mamoeiro. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Org.). **Mamão: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. v. 11, p. 37-46.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas L.*) e pimentão (*Capsicum annanum L.*)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação fungitóxic e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de Cipó Vick (*Tanaecium nocturnum*) e João Brandim (*Piper piscatorum*)**. 2007. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MAY-DE-MIO, L. L.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SINGH, H. N. P.; PRASAD, M. M.; SINHA, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease deve lop ment in banana. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 269-271, 1993.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. de. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya L.*). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

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

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo de doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F. S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, 2003. p. 229-307.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como a antracnose é uma doença de difícil controle que não existe variedade resistente, os métodos disponíveis além das medidas preventivas são o controle químico que é feito na pré-colheita e na pós-colheita combinado com o controle hidrotérmico. Entretanto é preciso desenvolver novas estratégias de controle como a utilização de produtos naturais como os óleos essenciais que são indispensáveis no cultivo orgânico, além de ser também uma alternativa para o controle convencional. Além disso, o uso de produtos naturais pode ser uma grande oportunidade para agregar valor ao produto, principalmente para o mercado externo. Porém é necessário, que se façam mais estudos de ajuste de metodologias de aplicação dos óleos essenciais na pré e pós-colheita de forma que consiga um controle eficiente do patógeno.

Neste trabalho verificou-se que o óleo essencial de cravo usado pelo método de imersão no controle da antracnose em frutos de mamão pode ser promissor. Doses maiores do que 300 ppm foram testadas pelo método de imersão utilizando os óleos essenciais de cravo, capim-limão e tomilho, destes os óleos de capim-limão e tomilho causaram fitotoxidez nos frutos.

O óleo essencial de tomilho pelo método de fumigação em concentrações maiores pode ser uma boa alternativa para o controle da antracnose.

Este mesmo experimento utilizando óleos essenciais no controle da antracnose por imersão e fumigação foi realizado em condições de refrigeração sob temperatura de 10 °C, porém não foram obtidos bons resultados quanto ao controle da doença.

Este trabalho teve uma boa contribuição, que foi a padronização da metodologia que utiliza a agulha de metal nº 6 para fazer ferimentos nos frutos

combinada com o estágio de maturação 2. Assim, pode-se recomendar esta metodologia para a realização de futuros trabalhos que tenham por objetivo inocular *C. gloeosporioides* em frutos de mamão e produzir sintomas de antracnose em laboratório.