

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA
E NO MANEJO DO OÍDIO DA SOJA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RILDANIA ABADIA BARCELOS

GUARAPUAVA-PR

2015

RILDANIA ABADIA BARCELOS

**ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO MANEJO DO OÍDIO
DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr (a). Cacilda Márcia Duarte Rios Faria

Orientador (a)

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

Co-orientador

GUARAPUAVA-PR

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

B242o Barcelos, Rildania Abadia
Óleos essenciais na indução de resistência e no manejo do oídio da soja / Rildania Abadia Barcelos. -- Guarapuava, 2015
xii, 66 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2015

Orientadora: Cacilda Márcia Duarte Rios Faria
Co-orientador: Paulo Roberto da Silva
Banca examinadora: Aline José Maia, Sérgio Miguel Mazaro

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Produção vegetal. 3. *Rosmarinus officinalis*. 4. *Cymbopogon citratus*. 5. defesa vegetal. 6. *Erysiphe difusa*. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

| CDD 633.34

RILDANIA ABADIA BARCELOS

**ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO MANEJO DO OÍDIO
DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2015

Dr(a). Aline José Maia – UNICENTRO

Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro – UTFPR

Prof(a). Dr (a). Cacilda Márcia Duarte Rios Faria
Orientador (a)

GUARAPUAVA -PR

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosilene e Firmino, e aos meus irmãos, Flávio e Rosinele, que são meus exemplos de vida e sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria pela orientação, amizade, confiança, apoio, paciência e por nunca ter medido esforços para me ajudar a conduzir os experimentos;

Ao prof Dr. Paulo Roberto Da Silva pela co-orientação;

À Drª. Aline José Maia pela paciência e pelas orientações e contribuições nos experimentos;

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual do Centro Oeste, em especial aos professores Dr. Renato Vasconcelos Botelho, Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende e a profª. Patrícia Carla Giloni de Lima pelos ensinamentos e por disponibilizarem os equipamentos e laboratórios para o desenvolvimento do trabalho;

À Anna Cláudia Oliveira, Ires Cristina Ribeiro Oliari, Julio José Nonato, amigos e a todos do laboratório de Fitopatologia pela amizade, pelos momentos que passamos juntos, e acima de tudo pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos;

À Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade da realização do curso do mestrado;

À Coodenação de Aperfeiçoamento do Nível Pessoal – CAPES, pela concessão de bolsa durante o mestrado;

Atodas as pessoas aqui omitidas e que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL.....	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
4. REFERENCIAL TEÓRICO	2
4.1. Culturada soja	2
4.2. Oídio da soja	3
4.3. Controle alternativo de doenças	5
4.4. Óleos essenciais	7
4.5. <i>Cymbopogon citratus</i>	7
4.6. <i>Rosmarinus officinalis</i>	8
4.7. Indução de resistência de plantas	8
4.8. Indução de fitoalexina	9
4.9. Espécies Reativas de Oxigênio	10
4.10. Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1).....	11
4.11. Peroxidase (EC 1.11.1.7).....	12
4.12. Trocas gasosas.....	13
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPITULO I. ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDUÇÃO DE FITOALEXINA E PEROXIDASES EM SORGO E FEIJÃO	26
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Local dos experimentos	29
2.2. Produtos utilizados	29
2.3. Descrição dos experimentos	29
2.4. Indução de Fitoalexina em sorgo	30
2.5. Indução de Fitoalexina em feijão	30
2.6. Extrato enzimático.....	31
2.7. Determinação de proteínas	31
2.8. Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7)	32
3. RESULTADOS.....	32
3.1. Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> na indução de fitoalexina e peroxidases em sorgo e feijão.....	32
3.2. Efeito do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> na indução de fitoalexina e peroxidases em sorgo e feijão.....	33
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPITULO II. ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DO OÍDIO DA SOJA.....	39
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Local dos experimentos	42
2.2. Produtos utilizados	42
2.3. Instalação e condução do experimento.....	42
2.4. Avaliação da doença.....	44
2.5. Análise enzimática	44

2.6.	Determinação de proteínas	45
2.7.	Extrato enzimático.....	45
2.8.	Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7)	46
2.9.	Atividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1).....	46
2.10.	Trocas gasosas	47
2.11.	Análise dos dados.....	47
3.	RESULTADOS.....	47
3.1.	Experimento 1: óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> no manejo do oídio da soja ..	47
3.2.	Experimento 2: óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> no manejo de doenças da soja	52
4.	DISCUSSÃO	57
5.	CONCLUSÃO	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	APÊNDICE	64
	ANEXOS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> na indução de fitoalexina em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).....	33
Figura 2. Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> na atividade da peroxidase em mesocótilos de sorgo. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).....	33
Figura 3. Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> na indução de fitoalexina em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).....	34
Figura 4. Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> na atividade da peroxidase em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).....	34
Figura 5. Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> na Área Abaixo da Curva do Progresso da doença (AACPD) de oídio (A), e porcentagem de desfolha em R6 (B) na cultura da soja. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).....	48
Figura 6. Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> no número de vagens planta ⁻¹ (A), no número de grãos planta ⁻¹ (B) e peso de mil grãos (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).....	48
Figura 7. Atividade da superóxido dismutase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . A = 24 horas após a primeira aplicação (primeira coleta); B = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); C = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).	49
Figura 8. Atividade da peroxidase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . A = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); B = 24 horas antes da terceira aplicação (quarta coleta); C = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta) e D = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014). 50	50
Figura 9. Trocas gasosas em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , 6 dias após a primeira aplicação. A =Taxa de assimilação de CO ₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$); B = Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$); C = Concentração interna de CO ₂ na câmara subestomática ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$); D =Taxa de transpiração (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E = Eficiência do uso da água (EUA, $\mu\text{molCO}_2 (\text{mmolH}_2\text{O})^{-1}$); e F = Eficiência instantânea de carboxilação [$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}$]. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 29/01/2014).	51
Figura 10. Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> na Área Abaixo da Curva do Progresso da doença (AACPD) de oídio (A), e porcentagem de desfolha em R6 (B) na cultura da soja. Análise de regressão apenas para as concentrações do óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).	52
Figura 11. Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> no número de vagens planta ⁻¹ (A); no	

número de grãos planta ⁻¹ (B) e no peso de mil grãos (C). Análise de regressão apenas para as concentrações do óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).	53
Figura 12. Atividade da superóxido dismutase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> . A = 24 horas após a primeira aplicação (primeira coleta); B = 24 horas antes da segunda aplicação (segunda coleta); C = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); D = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta); E = 24 horas antes da quarta aplicação (sexta coleta) e F = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).	54
Figura 13. Atividade da peroxidase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> . A = 24 horas antes da terceira aplicação (quarta coleta); B = 24 horas antes da quarta aplicação (sexta coleta) e C = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).	55
Figura 14. Trocas gasosas em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> , 6 dias após a primeira aplicação. A = Taxa de assimilação de CO ₂ (A, μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹); B = Condutância estomática (mol m ⁻² s ⁻¹); C = Concentração interna de CO ₂ na câmara subestomática (μmol CO ₂ mol ⁻¹); D = Taxa de transpiração (E, mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹); E = Eficiência do uso da água (EUA, μmolCO ₂ (mmolH ₂ O) ⁻¹); e F = Eficiência instantânea de carboxilação [(μmol m ⁻² s ⁻¹) (μmol mol ⁻¹) ⁻¹]. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 29/01/2014).	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Taxa de assimilação de CO ₂
AACPD	Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença
ASM	Acibenzolar-S-Metil
C _i	Concentração interna de CO ₂ na câmara subestomática
E	Taxa de transpiração da folha
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E _i C	Eficiência de carboxilação
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EUA	Eficiência do uso da água
IRGA	Analisador de gás infravermelho
NBT	Nitro blue tetrazólio
POX	Peroxidase
SOD	Superóxido dismutase

RESUMO

Rildânia Abadia Barcelos. Óleos essenciais na indução de resistência e no manejo do oídio da soja.

A soja é uma das oleaginosas mais consumidas no mundo e as doenças de plantas são um dos fatores limitantes de sua produção. Como forma de controle dessa doença é usual o uso de fungicidas. No entanto, vem aumentando a busca por produtos naturais que proporcionam menores riscos para a saúde do aplicador e consumidor final, além de diminuir a poluição ambiental e a seleção de raças resistentes. Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial dos óleos essenciais de capim-limão e alecrim na indução de resistência e no manejo de oídio de soja, bem como as respostas fisiológicas da cultura. Foram estudados óleos essenciais de capim-limão e alecrim (1000, 2000, 4000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-metil, fungicida, controle. Realizaram-se dois experimentos, sendo o primeiro avaliando os óleos essenciais na indução de resistência de plântulas de sorgo e feijão. Mesocótilos de sorgo e hipocótilos de feijão foram tratados com os óleos essenciais, submetidos em condições de indução de síntese de compostos de defesa e avaliados quanto a atividade de fitoalexinas e atividade de peroxidases. No segundo experimento os óleos foram aplicados na cultura da soja nos estádios fenológicos V9, R1, R2 e R3 e avaliou-se a severidade do oídio bem como a atividade enzimática, fatores de produção e fatores fisiológicos da cultura sob tais condições. Óleos essenciais de capim-limão e alecrim possuem a capacidade de induzir resistência em plântulas de sorgo e feijão, sendo que o óleo essencial de capim-limão ativa o metabolismo das fitoalexinas nas duas culturas e o óleo essencial de alecrim ativa as peroxidases no feijão. Os óleos essenciais de capim-limão e alecrim interferem no manejo de oídio da soja, sendo que o óleo essencial de capim-limão reduz a AACPD oídio. Ambos interferem nas respostas fisiológicas e nos mecanismos de resistência da cultura, demonstrando ainda haver especificidade quanto à concentração e modo de ação.

Palavras-Chave: *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, defesa vegetal, *Erysiphe difusa*.

ABSTRACT

Rildânia Abadia Barcelos. Alternative management of soybean diseases.

Soybean is one of the most consumed oil in the world and plant diseases are a major factor limiting production. As a way to control this disease is usual the use of fungicides. However, is increasing search for natural products that provide less risk to the health of the applicator and the end consumer, beside reduce environmental pollution and the selection of resistant strains. This work aimed to evaluate the potential of essential oils of lemongrass and rosemary in resistance induction and management of powdery mildew soybean, as well as the physiological responses of culture. Essential oils of lemongrass and rosemary (1000, 2000, 4000 and 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-methyl, fungicide control were studied. Two experiments were developed, the first evaluating the essential oils under the induction of resistance in sorghum and bean seedlings. Sorghum mesocotyls and bean hypocotyls were treated with essential oils, submitted in conditions of defense compounds synthesis and evaluated phytoalexin and peroxidase activities. In the second experiment the essential oils were applied in soybean growth stages in V9, R1, R2 and R3 and evaluated the severity of powdery mildew as well as the enzymatic activity, production factors and physiological factors of culture under such conditions. Essential oils of lemongrass and rosemary have the ability to induce resistance in sorghum and beans, and the essential oil of lemon grass activates the metabolism of phytoalexins in both cultures and the essential oil of rosemary active peroxidases in beans. The essential oils of lemongrass and rosemary interfere in the management of soybean powdery mildew, and the essential oil of lemon grass reduces powdery mildew AACPD. Both interfere with physiological responses and resistance mechanisms of the culture, demonstrating yet be specific as to the concentration and mode of action.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, plant defense, *Erysiphe difusa*.

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de agrotóxicos aliado a aplicações de forma errônea tem provocado uma crescente perda da eficácia dos fungicidas convencionais, favorecendo a seleção de raças resistentes de patógenos (LUIZ, 2013). Esses fatores aumentaram a busca por métodos alternativos de controle de fitopatógenos.

Produtos naturais extraídos de plantas, produzidos no metabolismo secundário das mesmas, podem atuar na proteção contra micro-organismos patogênicos (ITAKO, 2008). Tais produtos são classificados nos grupos dos terpenos, dos compostos fenólicos ou dos compostos nitrogenados. Pesquisas utilizando esses compostos mostram a eficácia dos mesmos no controle de fitopatógenos, podendo atuar diretamente sobre o patógeno, como substâncias tóxicas, ou mesmo pela indução de resistência das plantas (GACHKAR et al., 2007). No grupo dos terpenos encontram-se os óleos essenciais, os quais têm sido amplamente estudados no controle alternativo de doenças, apresentando resultados promissores, além de preservar o meio ambiente e os seres vivos, pois são biodegradáveis e produtos não tóxicos (SOYLU et al., 2006).

Óleos essenciais de capim-limão e alecrim possuem potencial antimicrobiano observado por alguns autores. Maia et al. (2014a) verificaram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* reduziu cerca de 30 e 50% a severidade da mancha da folha e do míldio da videira, respectivamente, em duas safras consecutivas, além de induzir a resistência das plantas, observada pelo aumento na atividade das quitinases e redução da atividade da catalase. Perina et al. (2013) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de canela, capim-limão, citronela, eucalipto e melaleuca sobre o controle do oídio da soja sob condições de casa de vegetação e observaram que os óleos essenciais apresentaram grande potencial no controle da doença. Em um de seus experimentos os autores observaram que o óleo essencial de capim-limão, na concentração de 1 mL L⁻¹, apresentou um controle de 67% da doença.

Há a necessidade de se estudar mais sobre os óleos essenciais em experimentos *in vivo*, visto, por exemplo, que a indução de resistência é dependente do elicitador empregado, da espécie analisada, das condições fisiológicas da planta e dos fatores ambientais (PASCHOLATI et al., 2008). A indução de resistência é um dos métodos alternativos para o manejo de doenças. Esse processo gera gastos energéticos para a planta e a determinação do uso dos recursos da planta para o crescimento ou defesa é pela competição por substrato

comum e energia. Os assimilados são disponibilizados através da fotossíntese, e utilizados para o crescimento produzindo biomassa estrutural. Parte dos assimilados é carregada para gerar defesas constitutivas e o excedente é conduzido para tecidos de reserva (GAYLER et al., 2004). Qualquer mudança que ocorra no interior da planta interfere na taxa de assimilação de CO₂ por ela e, conseqüentemente, na sua produtividade (PASCHOLATI et al., 2008).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial dos óleos essenciais de capim-limão e alecrim na indução de resistência e no manejo de oídio de soja, bem como as respostas fisiológicas da cultura.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial dos óleos essenciais de capim-limão e alecrim na síntese de metabólitos de defesa em plântulas de sorgo e feijão.

Avaliar os óleos essenciais de capim-limão e alecrim sobre o manejo de oídio da soja e o potencial de ativação de mecanismos de resistência nas plantas, bem como as respostas fisiológicas na cultura.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Culturada soja

A soja é uma planta pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine*, espécie cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (SEDIYAMA, 2009). Foi introduzida no Brasil em 1882 na região da Bahia, mas somente na década de 70 e 80, com a criação de programas de melhoramento de soja desenvolvendo cultivares adaptadas para as condições edafoclimáticas do país, que se expandiu sua produção (MISSÃO, 2006).

Cada vez mais a cultura da soja ganha destaque na agricultura mundial, sendo que a estimativa de produção mundial dessa oleaginosa na safra 2012/13 foi de 268 milhões de toneladas (CONAB, 2013). O Brasil, segundo maior produtor mundial de soja, apresentou

uma produção aproximada de 81,7 milhões de toneladas, superado apenas pelos Estados Unidos (FAO, 2013). Os estados que lideram a produção de soja no Brasil estão localizados nas regiões Centro Oeste e Sul do país. O estado de Mato Grosso, maior produtor nacional de soja, produziu quase 23,5 milhões de toneladas, na safra supracitada, aproximadamente 30% mais que o estado do Paraná (segundo colocado) (CONAB, 2013).

Fatores como fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, densidade de plantas, época de semeadura, características da cultivar, presença de plantas daninhas, e ataque de pragas e doenças afetam o potencial de rendimento da soja (BELEDELLI et al., 2012). Dentre esses fatores as doenças são as que mais limitam a produção desse grão no mundo. Os prejuízos anuais na produção devido às doenças são estimados de 15 a 20%, sendo que algumas podem chegar a 100% caso não se faça o manejo corretamente (GONÇALVES et al., 2009).

4.2. Oídio da soja

O oídio da soja pertence ao grupo dos Ascomycetos, da ordem Erysiphales, família Erysiphaceae, gênero *Erysiphe*, espécie *Erysiphe difusa* (SARTORATO e YORINORI, 2001). *Erysiphe diffusa* já foi conhecido como *Microsphaera diffusa*, entretanto, Takamatsu et al. (1999) realizaram uma análise filogenética molecular de estrutura miceliana encontrada nas folhas de soja e concluíram que tratava-se de *Erysiphe*, sendo o estágio perfeito provavelmente de *E. diffusa*, desse modo os autores propuseram uma nova classificação para o agente causal do oídio da soja.

A fase imperfeita destes fungos corresponde ao gênero *Oidium*, fase na qual ocorre a doença no Brasil, devido à ausência de temperaturas suficientemente baixas para o desenvolvimento do estágio perfeito ou sexuado do patógeno (SARTORATO e YORINORI, 2001). Os patógenos do grupo dos oídios apresentam uma forma bastante evoluída de parasitismo, eles exploram de um modo sutil, pois dependem do hospedeiro vivo para sua sobrevivência, crescimento e reprodução, e podem conviver durante todo o ciclo de vida com a planta ou mesmo levá-la a morte (CATELLI, 2009).

O ciclo de vida sob condições favoráveis permite que processo de pré-infecção, germinação e reprodução do fungo inicia-se após três horas da inoculação. O esporo do fungo ao entrar em contato com a folha germina e desenvolve o micélio que pode recobrir toda a planta. Após oito horas já ocorre a penetração nas células epidérmicas e dentro de sete a dez

dias ocorre a formação dos haustórios intracelulares e conídios (SARTORATO e YORINORI, 2001; YORINORI, 1997).

Os sintomas sempre se manifestam como manchas recobertas por uma massa pulverulenta esbranquiçada na forma de mofo de coloração branca ou levemente acinzentado que evoluem cobrindo toda a superfície foliar. As folhas ainda podem apresentar clorose seguida de necrose que conseqüentemente ocorrerá uma desfolha acentuada dependendo da cultivar e do desenvolvimento fúngico. Quando encontrada nas outras partes da planta atacada, como hastes, pecíolos e vagens, o oídio normalmente os recobre dando o aspecto pulverulento esbranquiçado típico da doença (CATELLI, 2009). Os sinais do patógeno são caracterizados por estruturas brancas, constituída por uma fina camada de micélio e conídios pulverulentos (ALVES et al., 2009).

A doença é observada mais frequentemente na face superior das folhas, aparecendo na forma de manchas ou toda a área foliar, e sua identificação pode ser feita de forma rápida e segura devido à presença dos sinais do fungo (estruturas do patógeno). Podem também se desenvolver em hastes e vagens, formando uma fina camada de micélios e esporos pulverulentos que recobrem toda a parte aérea (LESSIN e GHINI, 2009). Lavouras atacadas pelo oídio são facilmente identificadas à distância pela coloração prateada da face inferior das folhas quando expostas ao vento. Ataques severos podem provocar retorcimento, subdesenvolvimento e queda de folhas, morte de ramos novos, queda de flores, subdesenvolvimento e sintomas de crestamento (SARTORATO e YORINORI, 2001).

O oídio é uma das doenças mais antigas encontradas na cultura da soja, sendo o primeiro registro em 1921 na Alemanha (SARTORATO e YORINORI, 2001). Em 1931 foi relatada a primeira ocorrência da doença nos Estados Unidos em condições de casa-de-vegetação, em seguida, no ano de 1945, foi identificada a campo em final de ciclo de cultivar tardia, sem danos significativos (LESSIN, 2008). Desde então, há referências de ocorrência em praticamente todas as regiões produtoras no mundo (LESSIN e GHINI, 2009).

Os primeiros estados a apresentarem a constatação da doença em condições de campo foram Minas Gerais e Distrito Federal (PEREIRA et al., 2008). O oídio foi considerado uma doença secundária até a safra de 1995/96, entretanto registrou uma epidemia no Brasil na safra de 1996/97 (BLUM et al., 2002) e pode ocasionar reduções de até 40% no rendimento de cultivares suscetível (PEREIRA et al., 2012). Estes danos são decorrentes da retirada de nutrientes das células pelos haustórios intracelulares, da interferência do fungo no processo de

fotossíntese pela diminuição da quantidade de luz na superfície das folhas que pode reduzir mais da metade a atividade fotossintética, além de reduzir substancialmente a transpiração (MIGNUCCI e BOYER, 1979).

A doença encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras do país (EMBRAPA, 2011). As plantas voluntárias ou as sojas guaxas são as principais fontes de inóculo. Outros fatores que favorecem a infecção são a época de semeadura, resistência do cultivar e estágio de desenvolvimento da cultura (YORINORI, 1997). Segundo Mignucci e Lim (1980) folhas inferiores de plantas mais jovens são mais suscetíveis do que folhas superiores.

O fungo é facilmente disperso pelo vento podendo alcançar longas distâncias e se espalha pela lavoura de forma generalizada. Pode atacar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais suscetível no início da floração. A infecção é favorecida por temperaturas entre 18 e 24°C e umidade relativa do ar entre 50 e 90%, todavia, temperaturas acima de 30°C e precipitações intensas e frequentes constituem fatores inibidores ao desenvolvimento do fungo (SARTORATO e YORINORI, 2001). Algumas práticas como o uso de cultivares resistentes, plantio em época desfavorável para o patógeno, densidade de plantio, adubação equilibrada tem amenizados as perdas pela doença (PEREIRA et al., 2012; GALLOTTI et al., 2005).

4.3. Controle alternativo de doenças

Existem diversas medidas preventivas de controle de doenças para a cultura da soja, tais como vazio sanitário, rotação de cultura, emprego de cultivares resistentes, época de semeadura, densidade de semeadura, acompanhamento das condições climáticas e monitoramento da lavoura (PERINA et al., 2013; MEDICE et al., 2013). O uso de fungicidas também é utilizado para o controle de doenças, entretanto o uso indiscriminado desses produtos, aliado a aplicações de forma errônea, tem favorecido a seleção de raças resistentes (GHINI e KIMATI, 2000). A crescente perda da eficácia dos fungicidas convencionais devido à resistência dos micro-organismos patogênicos e a inaceitabilidade do uso de alguns produtos sintéticos, restringidos devido a possível carcinogenicidade, alta toxicidade, longos períodos para sua degradação e alto risco de poluição ambiental; tem aumentado a preocupação de pesquisadores, produtores e consumidores (SOYLU et al., 2006).

Existem diversos produtos alternativos para o controle de doenças como as caldas (calda bordalesa, calda sulfonada, calda viçosa e muitas outras), biofertilizantes, extratos de plantas, óleos essenciais, entre outros (PERINA et al., 2013; MEDICE et al., 2013). As plantas medicinais produzem compostos secundários que podem ser ativos contra patógenos e são biodegradáveis a produtos não-tóxicos, dessa forma tornam-se potencialmente adequados para uso em programas de manejo integrado de doenças (SOYLU et al., 2006). Tais compostos constituem uma rica fonte de produtos bioativos, tais como os fenóis, flavonoides, taninos, quinonas, alcalóides, saponinas, esteroides, terpenos, cumarinas, benzenóides, xantonas e lactonas (BURT, 2004; CASTRO et al., 2004; ISMAN, 2000).

Esses compostos não estão diretamente ligados ao metabolismo primário das plantas, mas possuem função de proteção das mesmas contra outras plantas (alelopatia), contra animais (anti-herbivoria) e micro-organismos (patogênica), ou mesmo na atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes (ITAKO, 2008). Sob o aspecto patogênico, pesquisas desenvolvidas utilizando compostos de plantas biologicamente ativos tem indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, atuando como substâncias tóxicas aos patógenos ou mesmo pela indução de resistência das plantas (GACHKAR et al., 2007).

Os compostos secundários produzidos pelas plantas podem ser classificados em três grandes grupos: a) terpenos; b) compostos fenólicos e; c) compostos nitrogenados. No grupo dos terpenos encontram-se os piretróides, óleos essenciais, cardenólídeos e saponinas. No grupo dos compostos fenólicos estão as ligninas, fitoalexinas e taninos. E no grupo dos compostos nitrogenados estão os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinatos, aminoácidos não-protéicos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Óleos essenciais de plantas são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela sua fragrância. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules das plantas. Devido a sua capacidade antioxidante, antifúngica, antirrepelente, tem sido fonte de pesquisa e desenvolvimento para novos produtos (TISSERAND e BALACS, 1999).

Morais (2009) estudou o emprego de óleos essenciais de plantas para controle fitossanitário, devido à produção de compostos secundários das plantas que podem servir para esse fim. Taiz e Zeiger (2004) citam que esses compostos, também conhecidos como metabólitos secundários, servem de estratégia de sobrevivência para as plantas. Os autores também citam exemplos de metabólitos secundários sintetizado pelas plantas, como as fitoalexinas, produzidas como consequência de estresses físicos, químicos ou biológicos.

Alguns autores estudaram os efeitos de óleos essenciais sobre doenças de plantas e observaram controle promovido pelo uso desses. Assim, nota-se que esses produtos apresentam ação fungitóxica diretamente pela inibição da esporulação ou do desenvolvimento do fungo, ou ainda de forma indireta, pela indução de resistência (TATSADJIEU et al., 2009; BONALDO et al., 2007; SALGADO et al., 2003; FIORI et al., 2000).

4.4. Óleos essenciais

Metabólitos secundários de plantas, tais como óleos essenciais e extratos de plantas são conhecidos por apresentarem atividades inseticida, fungicida, acaricida, antibacteriana e atividade citotóxica (FALEIRO et al., 1999). Eles têm sido amplamente estudados e aplicados nos campos da farmacologia, botânica, microbiologia, fitopatologia e conservação de alimentos (DAFERERA et al., 2000). Os estudos têm se concentrado em relação às propriedades biológicas e antimicrobianas dos óleos essenciais (CELIKTAS et al., 2007).

4.5. *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf também é conhecido popularmente no Brasil como capim-limão, erva cidreira, capim cidreira, capim-santo. É uma espécie pertencente à Família Poaceae, uma das maiores famílias botânicas, denominada popularmente como gramíneas (GOMES e NEGRELLE, 2003). O estado do Paraná lidera em relação a produção de plantas medicinais aromáticas no país e o capim-limão ocupa posição de destaque nesta produção e tem sido muito valorizado no estado. Na safra 2007/2008 o estado do Paraná totalizou 2.029,7 t, ocupando 102,6 ha distribuídos em 21 municípios produtores. O valor bruto da produção agrícola da safra totalizou R\$ 1.045.308,00 (PINTO et al., 2014).

A planta de capim-limão sempre foi muito utilizada devido a seu efeito analgésico e calmante. O óleo essencial desta espécie é utilizado mundialmente como componente aromático em indústria de alimentos, cosméticos e perfumaria, sendo um dos óleos essenciais mais importantes e comercializados (ITAKO, 2008; QUEIROZ, 1993). O principal componente desse óleo essencial é o citral, mas também há a presença significativa de mirceno, limoneno, nonanal, nerol, geraniol, linalol e terpineol (MAIA et al., 2014a; BERTINI et al., 2005; EL FATTAH et al., 1992). O citral é uma mistura de isômeros e possui

atividade antimicrobiana reconhecida contra diversos micro-organismos, sendo também usado como larvicida, inseticida, além de apresentar propriedades antifúngicas (PARANAGAMA et al., 2003; MING et al., 1996).

4.6. *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis L., conhecido popularmente no Brasil como alecrim, pertence à família Lamiaceae, e é muito utilizado como um condimento alimentar, também é conhecido por sua capacidade antibacteriana, propriedades antimutagênicas e como agente quimiopreventivo (OLUWATUYI et al., 2004). Devido às propriedades antioxidantes das folhas, o alecrim tem sido amplamente aceito como uma das especiarias com a maior atividade antioxidante (WANG et al., 2008; PENG et al., 2005).

Os principais componentes do óleo essencial de alecrim são: 1,8 cineol (eucaliptol), cânfora, α -pineno, β -cariofileno e canfeno (MAIA et al., 2014b). Gachkar et al.(2007) confirmaram que os metabólitos 1,8 cineol, α -pineno, borneol e cânfora são ativos contra micro-organismos. Lorenzi e Matos (2006) comprovaram a capacidade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim contra *Staphylococcus* e *Monilia*.

4.7. Indução de resistência de plantas

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa que são extremamente eficientes. A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em retardar ou impedir a entrada do patógeno e sua atividade contra a planta. A defesa das plantas contra os patógenos pode ocorrer com mecanismos pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis) (PASCHOLATI et al., 2008). Esses mecanismos constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, ou em barreiras químicas que são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno (STANGARLIN et al., 2011; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Os mecanismos pré-formados, também chamados de constitutivos, são aqueles presentes na planta independente da ação do patógeno e se dividem em dois grupos: estruturais e bioquímicos. No grupo dos pré-formados estruturais pode-se citar a presença de cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores, pilosidade e camada de sílica, neste

grupo as estruturas formadas possuem outras funções na planta além da resistência (BARROS et al., 2010). No grupo dos mecanismos bioquímicos pré-formados encontram-se substâncias químicas da classe dos fenóis, alcalóides, glicosídeos, lactonas, terpenóides e algumas proteínas, presentes nas plantas em altas concentrações nas plantas sadias independente da presença do patógeno que podem se tornar altamente tóxicas para o patógeno no início da infecção (PASCHOLATI et al., 2008).

Os mecanismos pós-formados, também chamados de induzíveis, são aqueles ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, e são ativados pela ação do patógeno ou em resposta de um eliciador. São divididos em dois grupos: estruturais e bioquímicos. No grupo dos pós-formados estruturais pode-se citar a formação de papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e glicina, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses. No grupo dos bioquímicos pós-formados encontram-se as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (β -1,3 glucanases e quitinasesdegradadoras da parede celular dos fungos), espécies ativas de oxigênio e fototoxinas (PASCHOLATI et al., 2008).

A indução de resistência pode atuar no local da infecção ou nos tecidos tratados com o indutor, como também pode atuar de forma sistêmica, manifestando-se em outra parte da planta, longe do local de aplicação do indutor (MORAES, 1992). A proteção da planta devido à indução de resistência é dependente do intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o ataque do patógeno. Uma vez ativada seus mecanismos de defesa o efeito pode persistir por poucos dias ou por todo o período de vida da planta, reduzindo a necessidade de outras aplicações para o controle de doenças (PASCHOLATI, 2011).

4.8. Indução de fitoalexina

As fitoalexinas constituem um grupo de metabólitos secundários que pertencem a diversos grupos químicos, tais como os isoflavonóides e sesquiterpenos. Geralmente as fitoalexinas não estão presentes nas plantas, mas são produzidos rapidamente pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (STANGARLIN et al., 2011; TAIZ e ZEIGER, 2004). Elas possuem capacidade antimicrobiana e são capazes de se acumular no local da infecção a níveis que limitam o desenvolvimento do patógeno e são tóxicas para protoplastos, células animais, bactérias e fungos (BARROS et al., 2010; DEFFUNE, 2001).

O modo de ação das fitoalexinas sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de

enzimas fúngicas, promovendo inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução total ou parcial do crescimento micelial (BRAGA, 2008).

Óleos essenciais podem conter diversas substâncias orgânicas com potencial eliciador, tais como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Essas substâncias são encontradas em alta concentração e diversidade nos óleos essenciais, possivelmente pela forma de obtenção e por ser um produto concentrado. Pesquisas para avaliar o potencial de diferentes preparados de pitangueira demonstraram que o óleo essencial apresentou destacável efeito ativação de mecanismo de defesa em plantas por meio da indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, sendo superior aos demais preparados obtidos por extrato alcoólico 40%, infusão 40%, decocção 40%, maceração 40% e quitosana (1%) (MAZARO et al., 2008).

4.9. Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas reduzidas, transitórias, altamente reativas produzidas durante a transformação do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). Especialmente os radicais superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são encontrados nas células vegetais resultante do metabolismo aeróbio normal. As plantas possuem mecanismos de defesa celular para manter essas espécies de oxigênio abaixo dos níveis prejudiciais, para isso incluem a ação de várias enzimas e algumas substâncias antioxidantes (PASCHOLATI et al., 2008).

Quando a planta passa por algum tipo de estresse, biótico ou abiótico, ocorre a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio que podem exceder a capacidade do sistema de limpeza, resultando num aumento da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, danos ao plasma estrutural e função da membrana (PEIXOTO et al., 1999). Além de atuar na peroxidação de lipídios da membrana plasmática, as EROs também podem atuar diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; ou mesmo fortalecendo a parede celular, favorecendo a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais (PASCHOLATI et al., 2008).

As EROs podem ser formadas principalmente por três mecanismos: a) reações de oxigênio com íons de metais de transição descompartimentalizados; b) reação colateral da

cadeia de transporte de elétrons; ou c) reações enzimáticas normais (BAYNES, 2007). A redução parcial de O_2 resulta em moléculas reativas de importância biológica como o superóxido (O_2^-), considerado precursor de muitas EROs. A dismutação do O_2^- pode ocorrer espontaneamente ou pela atividade da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a reação produzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser reduzido totalmente à água pela ação das enzimas catalase e peroxidase ou ser reduzido parcialmente ao radical hidroxila (OH) (TURRENS, 2003).

A propriedade antioxidante de óleos essenciais pode ser atribuída a sua atividade antiradical livre contra radicais alquil e em um grau menor contra o ânion superóxido. Essa atividade antioxidante é determinada por diversos fatores, como sua reatividade frente ao radical, número de radicais que consegue seqüestrar, destruição do radical gerado pelo antioxidante, concentração e mobilidade, interação com outros antioxidantes e sítio de geração e reatividade do radical. Após a análise de pesquisas com óleos essenciais de *Baccharis uncinella* e *B. dracunculifolia* verificou-se que ambos possuem atividade antioxidante quando avaliados pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico (FERRONATO et al., 2006).

4.10. Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1)

Superóxido dismutase (SOD) são as primeiras enzimas a atuarem no sistema de defesa antioxidante e são as únicas enzimas capazes de regular a concentração de O_2^- e H_2O_2 , sendo um fator importante no mecanismo de defesa das plantas, além de prevenir a formação de radicais hidroxilas, que são altamente tóxicos para as plantas (ALSCHER et al., 2002; LEON et al., 2002).

As SODs são metaloenzimas que podem ser classificadas de acordo com os grupos ligados a sua forma molecular: ligado a metais Mn, Fe ou Cu/Zn (GOMES JUNIOR, 2006). A Mn-SOD é encontrada nas mitocôndrias e raramente nos cloroplastos de algumas plantas, enquanto a Fe-SOD está mais associada aos cloroplastos, apesar de ser observada em um número mais limitado de plantas. Já as Cu/Zn-SOD são mais abundantes, geralmente encontradas no citosol e cloroplastos (VITORIA et al., 2001; AZEVEDO et al., 1998).

A enzima SOD catalisa a dismutação de O_2^- e seus produtos de reação são H_2O_2 e O_2 . Uma vez que a atividade da SOD resulta na formação de H_2O_2 isso demonstra estar

intimamente ligada às enzimas catalase (CAT) e peroxidase (POX), essa interação tem a finalidade de garantir um balanço altamente otimizado para reduzir os danos oxidativos nas plantas, visto que a regulação dos genes de SOD é muito sensível a estresses ambientais presumivelmente como uma consequência do aumento de formação das espécies reativas de oxigênio. Os altos níveis de estresse oxidativo resultam na alta degradação da proteína SOD requerendo uma nova síntese de SOD para manter níveis adequados da enzima para uma proteção efetiva. (GOMES JUNIOR, 2006).

O aumento da atividade da SOD após aplicação de algum possível eliciador é um indicativo da indução de resistência. Xavier (2014) alega que o aumento da atividade enzimática possivelmente se deve pelo reconhecimento dos oligogalacturonídeos pelas plantas ativando as respostas de defesa das plantas, dentre as quais se observa a síntese da SOD.

4.11. Peroxidase (EC 1.11.1.7)

A enzima peroxidase (POX) está envolvida em diversos processos fisiológicos de grande importância. Atua no processo de biossíntese da lignina em plantas catalisando a oxidação e a polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na biossíntese do hormônio vegetal etileno, oxidação de compostos fenólicos, que se acumulam em resposta a infecção, na degradação do ácido indolil-3-acético, participando na defesa contra patógenos (ITAKO, 2008; FERNANDES, 2003).

A POX está presente em todas as plantas verdes, em algumas células animais e de micro-organismos. São encontradas em vários locais da célula, tais como vacúolos, parede celular, citosol e apoplasto. Algumas dessas enzimas são expressas naturalmente durante o desenvolvimento da planta, enquanto outras são induzidas durante estresse biótico ou abiótico (HIRAGA et al., 2001).

A enzima POX é classificada como uma glicoproteína relacionada à patogênese (PR-proteína) pertencente à família PR-9. Pode ser dividida em três superfamílias com base na sua composição estrutural e característica catalítica: planta peroxidase, animal peroxidase e catalase peroxidase. Dentro da superfamília planta peroxidase encontram-se três classes: a classe I é formada pelas peroxidases intracelulares de plantas, bactérias e leveduras, como a citocromo c peroxidase e a ascorbato peroxidase; a classe II consiste em peroxidases

extracelulares de fungos e a classe III, que compreende as classes vegetais, composta pelas peroxidases secretadas no apoplasto (SILVA et al., 2012; HUSSAIN, 2010; PASSARDI et al., 2007).

A classe III apresenta uma altadiversidade de substratos que reagem com compostos que contém grupo hidroxila ligado a anel aromático, e uma alta diversidade de isoformas de peroxidases. Rotineiramente, utiliza-se o substrato guaiacol para se determinar a atividade das peroxidases totais (VILLA, 2010). A oxidação desidrogenativa do guaiacol resulta na formação de radicais fenoxi e a subsequente ligação de radicais instáveis leva à polimerização não enzimática de monômeros (HIRAGA et al., 2001).

A POX catalisa a oxirredução do H_2O_2 e o convertem em água na presença de um substrato (STANGARLIN et al., 2011). Além de reduzir o nível de peróxido de hidrogênio por meio da polimerização de álcoois hidroxicinamil durante a biossíntese da lignina e da ligação cruzada das proteínas de parede celular, as peroxidases também podem gerar H_2O_2 que lhes servirá de substrato (TOMÁNKOVÁ et al., 2006; MLÍČKOVÁ et al., 2004).

As enzimas antioxidantes são importantes nos processos de defesa da planta, na maioria dos casos, o aumento na atividade da POX está diretamente relacionado à redução da severidade da doença. Aplicação preventiva de óleo essencial de *C. citratum* em folhas de tomate aumentou a atividade enzimática local em folhas tratadas e sistêmico em folhas não tratadas, além disso, também promoveu a formação de papilas e lignificação de células epidérmicas, que contribuíram para o controle da pinta preta do tomateiro (ITAKO, 2008).

4.12. Trocas gasosas

A relação entre a fotossíntese e a respiração é fundamental para caracterização da produtividade da planta, entretanto são afetados por diversos fatores como temperatura, fluxo de irradiação, estresses, limitações metabólicas, bem como a sanidade das plantas. A redução da fotossíntese e/ou aumento da respiração reduz a assimilação do CO_2 e, conseqüentemente, interfere no acúmulo de biomassa pela planta (CATUCHI et al., 2012; PINHEIRO e CHAVES, 2011). Tomazeli (2010) alega que a maior taxa de assimilação de CO_2 observada nos tratamentos estudados está relacionada com a boa sanidade das plantas, que no estudo foi promovida pela indução de resistência das plantas tratadas com harpina.

O processo de indução de resistência gera gastos energéticos para a planta e a

determinação do uso dos recursos da planta para o crescimento ou defesa é determinada pela competição por substrato comum e energia, sendo que a planta deve balancear os investimentos nesses processos. Os assimilados são disponibilizados através da fotossíntese e utilizados para o crescimento produzindo biomassa estrutural. Parte dos assimilados é carregada para gerar defesas constitutivas e o excedente é conduzido para tecidos de reserva. Quando a planta necessitar, estes fotoassimilados são carregados para a defesa induzível e se a disponibilidade dos mesmos for baixa, pode ocorrer a inversão por parte das reservas e estas voltam a ser disponíveis (GAYLER et al., 2004).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVES, M.C.; POZZA, E.A.; COSTA, J.C.B; FERREIRA, J.B.; ARAÚJO, D.V. Intensidade do oídio *Microsphaera diffusa* CKE. & PK. Em cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1926-1930, 2009.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutante of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, Mar/April, 2010.

BAYNES, J. W. Oxigênio e vida. In: BAYNES, J. W.; MAREK, H. D. **Bioquímica médica**. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2 ed., p. 511-520, 2007.

BELEDELLI, D.; CASSETARI NETO, D.; CASSETARI, L.S.; MACHADO, A.Q. Viabilidade de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Sidow na ausência do hospedeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 604-612, July/Aug, 2012.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BLUM, L.E.B., REIS, E.F., PRADE, A.G. & TAVELA, V.J. Fungicidas e mistura de fungicidas no controle do oídio da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 216-218, 2002.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 383-387, 2007.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. FEALQ, Piracicaba, p.305-346, 2008.

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

CASTRO, H.G. FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. da; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2. ed., Visconde de Rio Branco, 113p., 2004.

CATELLI, L.L. **Resistência da soja à ferrugem asiática e ao oídio: herança de caracteres quali-quantitativos emapeamento genético**. 2009. 106f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

CATUCHI, T.A.; GUIDORIZZI, F.V.C.; GUIDORIZI, K.A.; BARBOSA, A.M.; SOUZA, G.M. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 4, p. 519-527, 2012.

CELIK TAS, O.Y.; E.E. KOCABAS, H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, Oxford, v.1, n.100, p.553-559, 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 29 jul.2013.

DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., POLISSIOU, M. G. GC–MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Freising, v. 48, p. 2576–2581, 2000.

DEFFUNE, G. Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas. **Agroecológica**, Botucatu, p.33-43, 2001.

EL FATTAH, M.; EL ZAHWEY, A.; HARIDY, I.M.; EL DEEB, S.A. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal of Agricultural Research**, River Nile, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/SP15-VE.pdf>> Acesso em: 29.jul.2013.

FALEIRO, L.; MIGUEL, G. M.; GUERRERO, C. A. C.; BRITO, J. M. C. Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) L. SSP. *mastichina* and *Thymus albicans*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 501, p. 45-48, 1999.

FAO. FAOSTAT - **Agricultural statistics database**. Rome: **World Agricultural Information Centre**, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 29.mar.2015.

FERNANDES, I.M.F. **Atividade e polimorfismo da superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato de folhas de *Solanum tuberosum* L. tratadas com *Phytophthora infestans* em situação de não carência hídrica e carência hídrica**. 2003. 111p. Dissertação (Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2003.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Arquivo de Ciência da Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 67-70, mai./ago. 2006.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, 2000.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, p. 898–904, 2007.

GALLOTI, G. J. M.; BALBINOT JR., A. A.; BACKES, R. L. Efeito da época de semeadura e da aplicação de fungicidas no progresso da ferrugem asiática, oídio e doenças de final de ciclo na cultura da soja. **Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.4, n. 2, 87 - 93, 2006.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in Young Apple trees. **Trees**, Vancouver, v. 18, p. 363-371, 2004.

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

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2003.

GOMES JUNIOR, R.A. **Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)**. 2006. 134p. Tese (Doutorado em Agronomia) - ESALQ, Piracicaba, 2006.

GONÇALVES, E.C.P.; CENTURION, M.A.P.C.; DI MAURO, A.O. Avaliação da reação de genótipos de soja ao oídio em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.2, p.151-153, 2009.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large Family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HUSSAIN, Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Delft, v. 9, p.117-140, 2010.

ISMAN, B.M. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 603–608,2000.

ITAKO, A.T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR, 2008.

LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R.M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Antioxidative enzymes in cultivars od peppers plants with diferente sensitivity to cádmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 813-820, Paris,2002.

LESSIN, R.C. **Efeito do aumento da concentração de CO₂ atmosférico sobre o oídio, a ferrugem e o desenvolvimento de plantas de soja**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

LESSIN, R.C.; GHINI, R. Efeito do aumento da concentração de CO₂ atmosférico sobre o oídio e o crescimento de plantas de soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 385-392, Dec., 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**.

Instituto Plantarum, Nova Odessa, 1ª edição, 512 p., 2006.

LUIZ, C. **Efeito de polissacarídeos no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e da podridão negra da couve-flor (*Xanthomonas campestris*pv. *campestris*)**. 2013. 145p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.R.; OLIVEIRA, J.S.B.; JARDINETTI, V.A.; BATISTA, B.N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.49, n.5, p.330-339, 2014a.

MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; BATISTA, A.F.; COSTA, W.F.; BATISTA, B.N. The control of isariopsis leaf spot and downy mildew in grapevine cv. Isabel with the essential oil of lemon grass and the activity of defensive enzymes in response to the essential oil. **Crop Protection**, Guildford, v.63, p. 57–67, 2014b.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; DE GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, out, 2008.

MEDICE, R.; BETTIOL, W.; ALTÉA, U.Q.M. Effect of potassium bicarbonate on the severity of powdery mildew in soybean plants. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.1, p.35-39, 2013.

MIGNUCCI, J.S.; BOYER, J.S. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa* Powdery mildew. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 227–230, 1979.

MIGNUCCI, J.S.; LIM, S.M. Powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) development on soybeans with adult-plant resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.9, p.919-921, 1980.

MING, L.C.; FIGUEIREDO, R.O.; MACHADO, S.R.; ANDRADE, R.M.C. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 426, p. 555-559, 1996.

MISSÃO, M. R. SOJA: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, Paraná, p.7-15, jun. 2006.

MLIČKOVA, K.; LUHOVÁ, L.; LEBEDA, A.; MIESLEROVÁ B.; PEC, P. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 753-761, 2004.

MORAIS, L.A.P. Óleos essenciais no Controle Fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1ª edição, 2009.

MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v.65, p. 3249–3254, 2004.

PARANAGAMA, P.A.; ABEYSEKERA, K.H.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice lemon grass. **Letters in Applied Microbiology**, New York , v. 37, p. 86-90, , 2003.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba, ed. FEALQ, 627 p., 2008.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM, F.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**.

Agronômica Ceres, 4^a edição, Piracicaba, p. 593-633, 2011.

PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F.K.; PENEL, C.; DUNAND, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, v. 89, n. 5, 567-579, 2007.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.11, n. 3, p.137-143, 1999.

PENG, Y.; YUAN, J.; LIU, F.; YE, J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 431 - 437, 2005.

PEREIRA, D.G.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; REIS, M.S.; GOMES, J.L.L.; TEIXEIRA, R.C.; NOGUEIRA, A.P.O. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja avaliados para resistência ao oídio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1836-1842, 2008.

PEREIRA, D.G.; SEDIYAMA, T.; REIS, M.S.; CRUZ C.D.; GOMES, J.L.L.; TEIXEIRA, R.C. Avaliação da severidade do oídio [*Erysiphe diffusa* (U. Braun & S. Takam)] em genótipos de soja, em condições de campo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 3, p. 25-30, jul-set., 2012.

PERINA, F.J.; ALVES, E.; PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; LABORY, C.R.G.; CASTRO, H.A. Essential oils and whole milk in the control of soybean powdery mildew. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.11, p.1938-1944, nov, 2013.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.62, p.869-882, 2011.

PINTO, D.A.I.; MANTOVANI, E.C.I.; MELO, E. de C.I.; SEDIYAMA, G.C.I.; VIEIRA, G.H.S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.1, p. 54-61, 2014.

QUEIROZ, F. **Estudo da cinética de extração do óleo essencial de capim-limão com dióxido de carbono líquido**. 1993. 156p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.2, p. 249-254, 2003.

SARTORATO, A.; YORINORI, J.T. Oídios de Leguminosas: Feijoeiro e Soja. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Eds.) **Oídios**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.262-284, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. FEALQ, Piracicaba, p.227-248, 2008.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Ed. Mecenaz, 314p., 2009.

SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D.; TORRES, J.A.; AMORIM, M.T.S.P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.

SOYLU, E.M., SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v.

161, p. 119–128, 2006.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y.; NOMURA, Y. Phylogenetic relationship of *Microspheera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. **Mycoscience**, v. 39, 259–298, 1999.

TATSADJIEU, N.L.; JAZET DONGMO, O.M.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X.; MBOFUNG, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, Berkshire, v. 20, n. 2, p. 161-166, 2009.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals**. Churchill Livingstone. London, 1999.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M.; PEČ, P.; LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 22–32, 2006.

TOMAZELI, V.N. **Indução de resistência à doenças em morangueiro com o uso de Acibenzolar-S-metil e Harpina em pré e pós-colheita**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2010.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VILLA, G.A.S. **Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora ricotianae*: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos.** 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - ESALQ, Piracicaba, 2010.

VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701-710, 2001.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G.; FU, Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main componentes. **Food Chemistry**, Oxford, v.108, p. 1019–1022, 2008.

XAVIER, K.V. **Extratos de cascas de maracujá e de laranja na indução de resistência em cafeeiros contra a ferrugem e em tomateiro contra mancha bacteriana.** 2011. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, 2011.

YORINORI, J.T. **Oídio da Soja.** Londrina: Embrapa Soja, 13p., 1997.

CAPITULO I. ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDUÇÃO DE FITOALEXINA E PEROXIDASES EM SORGO E FEIJÃO

RESUMO

Óleos essenciais possuem potencial na ativação de respostas de defesa da planta, como a produção de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese. Visando contribuir para este conhecimento o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos óleos essenciais de capim-limão e alecrim na síntese de metabólitos de defesa de plântulas de sorgo e feijão. Foram estudados os óleos essenciais de capim-limão e alecrim (1000, 2000, 4000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-metil, além da testemunha com água destilada. Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Mesocótilos de sorgo e hipocótilos de feijão foram tratados com os óleos essenciais, submetidos em condições de indução de síntese de compostos de defesa e avaliados quanto à atividade de fitoalexinas e atividade de peroxidases. Os óleos essenciais de capim-limão e alecrim induziram a resistência em plântulas de sorgo e feijão, sendo que o óleo essencial de capim-limão ativa o metabolismo das fitoalexinas nas duas culturas e o óleo essencial de alecrim ativa as peroxidases no feijão.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, fitoalexinas, peroxidase.

CHAPTER I. ESSENTIAL OILS IN PHYTOALEXIN AND PEROXIDASE INDUCTION IN SORGHUM AND BEAN

ABSTRACT

Essential oils have potential in the activation of plant defense responses, such as the production of phytoalexins and pathogenesis-related proteins. To contribute to this knowledge, this study aimed to evaluate the potential of essential oils of lemongrass and rosemary in the synthesis of defense sorghum and bean seedlings metabolites. Essential oils were studied lemongrass and rosemary (1000, 2000, 4000 and 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-methyl, and a control with distilled water. The experiments were conducted in a completely randomized design with five replicates. Sorghum mesocotyls and bean hypocotyls were treated with essential oils, submitted in conditions of synthesis of defense compounds and evaluated phytoalexin and peroxidase activities. The lemongrass and rosemary essential oils have the ability to induce resistance in sorghum and beans, and the lemongrass essential oil activates the metabolism of phytoalexins in both cultures and the rosemary essential oil active peroxidases in beans.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, phytoalexin, peroxidase.

1. INTRODUÇÃO

No metabolismo secundário das plantas ocorre a produção de compostos que podem atuar na proteção das mesmas contra patógenos. Esses compostos são uma estratégia de sobrevivência como consequência de estresses físicos, químicos ou biológicos e um exemplo dessas substâncias que são sintetizadas pelas plantas são as fitoalexinas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de plantas de ervilha, desde então, diversas outras fitoalexinas foram caracterizadas, como as obtidas de feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada, banana, entre outras (BRAGA, 2007). As fitoalexinas podem ser induzidas após algum tipo de estresse, durante o processo de infecção ou mesmo por ação de algum elicitor e os óleos essenciais podem constituir uma forma de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Óleos essenciais extraídos de diversas plantas tem-se mostrado com potencial no controle de patógenos, tanto diretamente, com efeito tóxico aos patógenos quanto pela ativação dos mecanismos de defesa das plantas, dentre eles a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (GACHKAR et al., 2007; PASSARDI et al., 2007). Em sorgo são conhecidas quatro fitoalexinas: luteolinidina, 5-metoxiluteolinidina, apigeninidina e éster do ácido caféico de arabinisol 5-O-apigeninidina (NICHOLSON et al., 1987). No caso do feijão a faseolina é a fitoalexina importante na interação planta-patógeno (BAILEY e BURDEN, 1983).

Há necessidade de aprofundamento dos estudos dos óleos essenciais na atividade elicitora de fitoalexinas e suas respectivas dosagens. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* na síntese de fitoalexinas em plântulas de sorgo e feijão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Foram realizados dois experimentos seguindo a mesma metodologia, porém com tratamentos diferentes. Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da UNICENTRO – *campus* CEDETEG, no município de Guarapuava-PR.

2.2. Produtos utilizados

Foram utilizados óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), obtidos do horto de plantas medicinais localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, Universidade Estadual de Maringá (UEM) - PR, extraído por hidrodestilação a partir de 2,0 Kg de folhas secas ao ar (WORWOOD, 1995) e, também se avaliou o Acibenzolar-S-Metil (ASM – Bion[®] – empresa Syngenta), como testemunha, pois é um indutor registrado comercialmente, utilizado na concentração de 200 mg L⁻¹ do produto comercial.

2.3. Descrição dos experimentos

Foram realizados dois experimentos, com os óleos essenciais de capim-limão e alecrim, nas concentrações de 1000, 2000, 4000 e 8000 µL L⁻¹, para verificar se induziam a produção de fitoalexinas e atividade de peroxidase em plântulas de sorgo e feijão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada experimento de indução de fitoalexina. O material vegetal residual de cada experimento foi armazenado em freezer para posterior análise da atividade da peroxidase. Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott (p<0,05), utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.4.Indução de Fitoalexina em sorgo

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] híbrido ‘Jumbo’ foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% por 15 min, lavadas em água destilada e então embebidas em água destilada à temperatura ambiente por 6 horas. Posteriormente, foram enroladas entre folhas de papel germiteste umedecidas e incubadas no escuro por 4 dias à temperatura de 28°C. Após este período, as plântulas foram mantidas por 4 h na luz, visando paralisar a alongação dos mesocótilos (NICHOLSON et al., 1987).

Os mesocótilos obtidos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de ensaio (três mesocótilos/tubo) contendo uma alíquota de 1 mL de cada tratamento. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara úmida utilizando bandejas e sacos plásticos e mantidos na sala de crescimento a 25°C sob luz fluorescente (WULFF, 1999). Após 60 h, os mesocótilos foram secos e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5 cm), excetuando-se as folhas, foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em tubos para microcentrifuga contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4°C no metanol por 96 h para extração dos pigmentos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 480 nm (NICHOLSON et al., 1987). O material vegetal residual desta etapa (folhas) foi acondicionado em papel alumínio e congelado em freezer para serem utilizados na determinação da atividade enzimática (peroxidase).

2.5.Indução de Fitoalexina em feijão

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. ‘Cavalo’ foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos, posteriormente, foram lavadas em água destilada estéril e semeadas em areia esterilizada mantidas a 24°C no escuro. Após sete dias, foram cortados 5 cm dos segmentos de hipocótilo estiolado das plântulas, lavados em água destilada estéril e secados. Cinco segmentos de hipocótilo (aproximadamente 1 g) foram colocados em placa de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. Aplicou-se 20 µL do tratamento sobre cada hipocótilo. As placas de Petri foram mantidas em câmara tipo BOD a 25°C no escuro. Após 48 horas, quatro hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol e armazenados a 4°C por 48 horas para extração da

fitoalexina. Após esse período, os tubos de ensaio foram agitados por uma hora em uma mesa agitadora e, posteriormente, a faseolina formada foi mensurada indiretamente por absorvância em espectrofotômetro a 280 nm (BAILEY e BURDEN, 1983). O hipocótilo restante foi acondicionado em papel alumínio e congelado em freezer para ser utilizado na determinação da atividade enzimática.

2.6.Extrato enzimático

Primeiramente, preparou-se 100 mL de solução estoque de fosfato de potássio monobásico 1 M, sendo utilizado 13,61 g de KH_2PO_4 e então completou-se o volume para 100 mL com água destilada; preparou-se também a solução estoque de fosfato de potássio dibásico 1 M, utilizando 22,83 g de K_2HPO_4 e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Com as soluções estoques preparadas, combinou 61,5 mL da solução estoque de fosfato de potássio dibásico com 38,5 mL da solução estoque de potássio monobásico, completou o volume final para 1000 mL com água destilada, a fim de se obter o tampão fosfato de potássio 0,1 M; posteriormente o pH foi ajustado para 7,0, com as soluções estoques, e por fim adicionou 0,037 g de EDTA.

O material vegetal armazenado foi macerado em nitrogênio líquido, em almofaziz previamente resfriado com nitrogênio líquido, adicionando-se polivinilpirolidona (1% do peso do material vegetal utilizado) e tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) na proporção de 4 mL g^{-1} material vegetal. A suspensão vegetal foi colocada em tubos para microcentrífuga e centrifugada a 15000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em freezer para posterior determinação de proteína (BRADFORD, 1976) e da atividade enzimática (KAR e MISHRA, 1976).

2.7.Determinação de proteínas

Em béquer de 250 mL colocou-se 0,0615 g do corante Azul de Coomassie Brilhante G-250 e 50 mL de etanol 95%, mexeu-se com bastão de vidro até dissolver totalmente. Posteriormente adicionou, lentamente, 100 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e completou-se o volume de 1000 mL com água destilada. Filtrou-se a vácuo até que a absorvância apresentasse resultado entre 0,2 e 0,3 no espectrofotômetro a 595 nm e foi armazenado em

frasco âmbar identificado em geladeira. Durante toda a reação os materiais encontravam-se sobre gelo em escama para manutenção da temperatura e evitar degradação do material. Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL do extrato enzimático mais 2,5 mL do reagente Bradford, esses foram agitados em um agitador de tubos tipo vortex. Após 5 minutos foram efetuadas leituras em espectrofotômetro a 595 nm. A média da duplicata de cada amostra foi utilizada na equação da reta padrão de albumina bovina 50 mg, onde o resultado foi expresso em µg de proteína mL⁻¹, e foi transformado para mg de proteína mL⁻¹ para quantificação da atividade enzimática (BRADFORD, 1976).

2.8. Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7)

O substrato enzimático foi preparado adicionando 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio e completou o volume para 100 mL com tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), misturou-se em agitador magnético e foi mantida em banho-maria a 30°C. Para a determinação da atividade da peroxidase, adicionou-se 100 µL do extrato enzimático (LUSSO e PASCHOLATI, 1999) seguido de 2900 µL do substrato enzimático na cubeta que já se encontrava dentro do espectrofotômetro e imediatamente fechou-se este. A leitura foi realizada a cada 10 segundos por dois minutos a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na indução de fitoalexina e peroxidases em sorgo e feijão

O óleo essencial de capim-limão em mesocótilos de sorgo apresentou efeito linear negativo em relação à indução de fitoalexina, sendo que as concentrações de 1000, 2000 e 4000 µL L⁻¹ induziram 1550, 1409 e 1145 % a mais que a testemunha, respectivamente, não diferindo estatisticamente do ASM (Figura 1A), produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como um ativador de plantas. O óleo essencial apresentou efeito linear em hipocótilos de feijão, sendo que as concentrações induziram a produção de fitoalexinas similarmente ao ASM (Figura 1B).

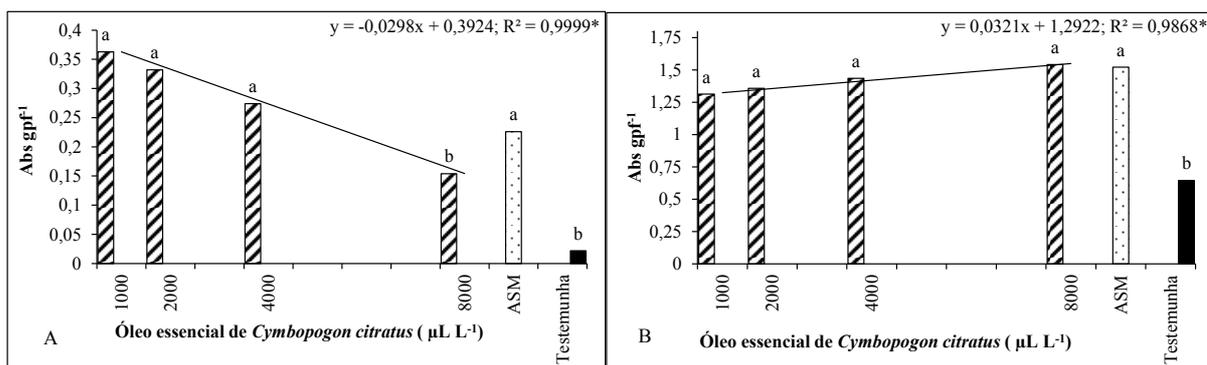


Figura 1. Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na indução de fitoalexina em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).

Na atividade da peroxidase em mesocótilos de sorgo, houve efeito linear negativo em função das concentrações do óleo essencial, entretanto não apresentando diferença estatística entre os tratamentos (Figura 2). Em hipocótilos de feijão não houve efeito significativo entre os tratamentos sendo que os valores ficaram dentro da normalidade para a cultura, com médias de $1,08 \text{ Abs min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

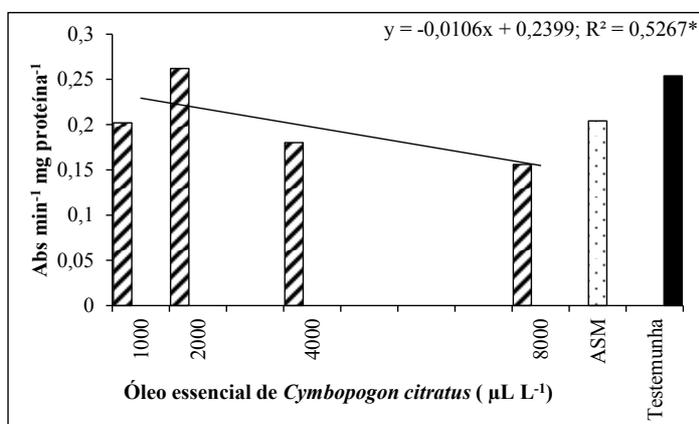


Figura 2. Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na atividade da peroxidase em mesocótilos de sorgo. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).

3.2. Efeito do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* na indução de fitoalexina e peroxidases em sorgo e feijão

O óleo essencial de alecrim apresentou efeito quadrático em relação a indução de

fitoalexina em mesocótilos de sorgo e em hipocótilos de feijão (Figura 3 A e B), sendo que em sorgo as concentrações do óleo essencial não diferiram significativamente da testemunha, apresentando baixa indução de fitoalexina (Figura 3 A), enquanto que em hipocótilos de feijão o óleo essencial induziu a síntese de fitoalexina semelhante ao ASM, diferindo da testemunha (Figura 3 B).

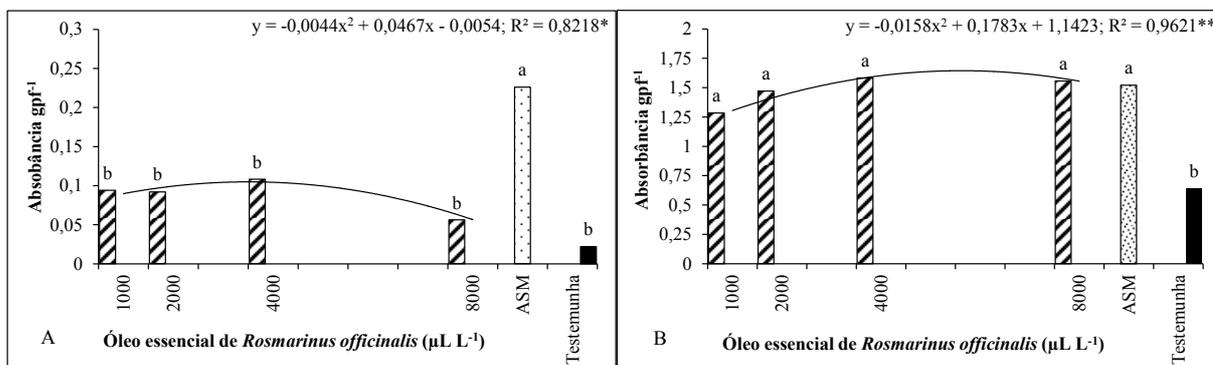


Figura 3. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* na indução de fitoalexina em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).

Em relação a atividade da peroxidase no material residual da indução de fitoalexina houve efeito quadrático em função das concentrações do óleo essencial tanto em sorgo quanto em hipocótilos de feijão (Figura 4A e B), sendo que em mesocótilos de sorgo não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 4A). As concentrações de 2000 e 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram maior atividade enzimática em hipocótilos de feijão (Figura 4B).

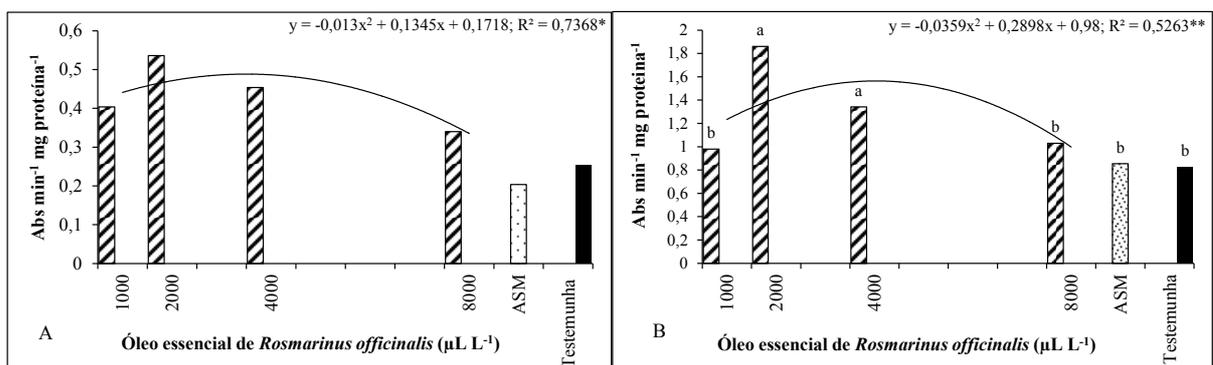


Figura 4. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* na atividade da peroxidase em mesocótilos de sorgo (A) e em hipocótilos de feijão (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2013).

4. DISCUSSÃO

A diferença de efeito na indução de fitoalexina observada pelas culturas de sorgo e feijão e pelos diferentes óleos essenciais estudados ocorre visto que a produção de fitoalexina pode variar com a espécie estudada, com o tecido inoculado, com as condições fisiológicas da planta, com fatores ambientais e com o agente indutor empregado (PASCHOLATI et al., 2008), além disso, as fitoalexinas formadas e a metodologia empregada em cada espécie são diferentes o que interfere na produção de fitoalexina (BRAGA e DIETRICH, 1987).

Alguns autores verificaram efeito semelhante, como Moreira et al. (2008), que observaram efeito antifúngico e elicitor de frações obtidas da citronela (planta pertencente ao mesmo gênero do capim-limão) extraídas de extratos brutos metanólicos de *C. nardus*, que induziram o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo cinco vezes mais, quando comparado com o controle (água destilada). Franzener et al. (2007) avaliaram o efeito dos hidrolatos de canela-de-veado, buva e citronela na atividade indutora de fitoalexinas em sorgo e observaram que o hidrolato de citronela proporcionou maior efeito na indução de fitoalexina, promovendo, na maior concentração, incremento de até 4,3 vezes em relação ao controle (água destilada esterilizada). Brand et al. (2010) avaliaram o efeito dos extratos aquosos de alho e alecrim autoclavados e não autoclavados sobre a produção de faseolina em feijoeiro e verificaram que a dose de 3% foi a mais efetiva na indução de faseolina, sendo superior ao indutor comercial ASM.

Em relação à atividade de peroxidase são observados efeitos aleatórios, também observado por Peiter-Beninca et al. (2008) ao avaliarem a indução de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com 100, 250, 500 e 750 mg/L de extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, os autores verificaram que mesmo com a indução de fitoalexina em mesocótilos de sorgo, não ocorreu resposta significativa para a peroxidase, obtendo R^2 relativamente baixo para os extratos.

5. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de capim-limão e alecrim possuem a capacidade de induzir resistência em pantulas de sorgo e feijão, sendo que o óleo essencial de capim-limão ativa o metabolismo das fitoalexinas nas duas culturas e o óleo essencial de alecrim ativa as peroxidases no feijão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J.A.; BURDEN, R.S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, London, v.3, n.1, p.171-177, 1983.

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

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. FEALQ, Piracicaba, p.305-346, 2008.

BRAGA, M.R.; DIETRICH, S.M.C. Defesas químicas de plantas: fitoalexinas. **Acta Botânica Brasileira**, v.1, n. 1, p.3-16, Jan, 1987.

BRAND, S.C.; BLUME, S.; MUNIZ, M.F.B.; MILANESI, P.M.; SCHEREN, M.B.; ANTONELLO, L.M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.9, p. 1881-1887, 2010.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p.1039-1042, 2011.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A.S.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M.P.; SCHWAN-ESTRADA, K.F.R.; CRUZ, M.E.S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, jan./mar. 2007.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus*

officinalis essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, p. 898–904, 2007.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 57, p. 315-319, 1976.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MOREIRA, C.G.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BONALDO, S.M.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 332-337, 2008.

NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science**, v.84, p.5520-5524, 1987.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba, ed. FEALQ, 627 p., 2008.

PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F.K.; PENEL, C.; DUNAND, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, v. 89, n. 5, 567-579, 2007.

PEITER-BENINCA, C.P.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v.30, p.129-137, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

WORWOOD, S. **Aromaterapia**: um guia de A a Z para o usoterapêutico dos óleos essenciais. São Paulo: Best Seller, 251p., 1995.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 428-435, 1999.

CAPITULO II. ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DO OÍDIO DA SOJA

RESUMO

O oídio da soja é uma das doenças de grande importância principalmente em condições de baixa umidade do ar e temperaturas amenas, ideais para seu desenvolvimento, o que aumenta o uso de fungicidas e conseqüentemente o risco para o ser humano e para o meio ambiente. Visando alternativas, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos óleos essenciais de capim-limão e alecrim no manejo de oídio de soja, bem como as respostas fisiológicas da cultura. Foram estudados óleos essenciais de capim-limão e alecrim (1000, 2000, 4000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-metil, fungicida convencional, além do controle (água). O experimento foi conduzido a campo em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. Os óleos foram aplicados na cultura da soja nos estádios fenológicos V9, R1, R2 e R3 e avaliou-se a severidade do oídio bem como a atividade da superóxido dismutase e da peroxidase e também fatores de produção e fatores fisiológicos da cultura. Os óleos essenciais de capim-limão e alecrim interferiram no manejo de oídio da soja, sendo que o óleo essencial de capim-limão reduziu a área abaixo da curva do progresso do oídio. Ambos interferem nas respostas fisiológicas e nos mecanismos de resistência da cultura, demonstrando ainda haver especificidade quanto à concentração e modo de ação.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Erysiphe difusa*.

CHAPTER II. ESSENTIAL OILS IN THE MANAGEMENT OF POWDERY MILDEW SOYBEAN

ABSTRACT

The powdery mildew soybean is a disease of major importance particularly in conditions of low humidity and warm temperatures, ideas for development, which increases the use of fungicides and therefore risk to humans and the environment. Aiming alternatives, this study aimed to evaluate the potential of essential oils of lemongrass and rosemary in the management of powdery mildew soybean, as well as the physiological responses of culture. Essential oils were studied lemongrass and rosemary (1000, 2000, 4000 and 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$), acibenzolar-S-methyl, conventional fungicide, beyond control. The experiment was conducted on a randomized complete block design with four replications. The essential oils were applied in soybean growth stages in V9, R1, R2 and R3 and evaluated the severity of powdery mildew and the activity of superoxide dismutase and peroxidase, and also factors of production and physiological factors of culture. The essential oils of lemongrass and rosemary interfere in the management of soybean powdery mildew, and the essential oil of lemon grass reduces the area under the powdery mildew progress curve. Both interfere with physiological responses and resistance mechanisms of the culture, demonstrating yet be specific as to the concentration and mode of action.

Keywords: *Rosmarinus officinallis*, *Cymbopogon citratus*, *Erysiphe diffusa*.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é suscetível a diversas doenças fúngicas e em safras que há ocorrências de estiagem, o oídio se torna relevante no quesito econômico, pois há formação da estrutura do fungo sobre as folhas, que dificulta a interceptação da radiação solar pelas plantas, reduzindo assim a fotossíntese e conseqüentemente sua produção. Uma das soluções encontradas pelos produtores é o aumento do uso de fungicidas, o que aumenta o risco para a saúde e para o meio ambiente bem como o custo da produção (EMBRAPA, 2011; IGARASHI et al., 2010).

O uso de produtos com menores riscos para o ambiente e para o ser humano tem grande potencial e vai ao encontro de sistemas produtivos adaptados reduzindo ou até mesmo eliminando os efeitos negativos do uso de agrotóxicos. Os indutores de resistência agem estimulando a produção de metabólitos secundários e proteínas relacionadas à patogênese, responsáveis pela defesa natural das plantas e, portanto, apresentam-se como uma linha de produtos de baixo impacto (PASCHOLATI et al., 2008).

Pesquisas utilizando metabólitos secundários de diversas plantas revelam a eficácia dos mesmos no controle de fitopatógenos. Gachkar et al.(2007) afirmam que estes compostos podem atuar diretamente sobre o patógeno, como substâncias tóxicas, ou mesmo ativando as respostas de defesa da planta.

Poucos são os estudos com eliciadores para cultura da soja, sendo necessárias maiores informações pertinentes aos efeitos sobre fitopatógenos, produtividade, atividade fotossintética, e o efeito de diferentes eliciadores e suas respectivas dosagens. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar os óleos essenciais de capim-limão e alecrim sobre o manejo de oídio da soja e o potencial de ativação de mecanismos de resistência nas plantas, bem como as respostas fisiológicas na cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Foram realizados dois experimentos seguindo a mesma metodologia, porém com tratamentos diferentes. Os ensaios foram instalados na safra 2012/2013 no campo experimental do Departamento de Agronomia da UNICENTRO – *campus* CEDETEG, no município de Guarapuava-PR, localizada na latitude 25°23'36"S e na longitude 51°27'19" W, com altitude aproximada de 1.120 m. O clima regional é classificado como Cfb – subtropical mesotérmico úmido, de acordo com a classificação de Köppen e Geiger (1928). Pelo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS, 2013) o solo do local é classificado como Latossolo Bruno distroférico. Os dados climáticos no período do experimento foram obtidos da Estação Meteorológica da Unicentro/Iapar, localizada a aproximadamente 200 m da área experimental.

2.2. Produtos utilizados

Foram utilizados os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), obtidos do horto de plantas medicinais localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, Universidade Estadual de Maringá (UEM) - PR, extraídos por hidrodestilação a partir de 2,0 Kg de folhas secas ao ar (WORWOOD, 1995). Foram também avaliados os tratamentos Acibenzolar-S-Metil (ASM – Bion[®] – empresa Syngenta), que é um indutor registrado comercialmente, utilizado na concentração de 200 mg L⁻¹ do produto comercial e um fungicida utilizado no cultivo convencional de soja (azoxistrobina + ciproconazole, 300 mL pc ha⁻¹), como padrão e a testemunha, sem aplicação

2.3. Instalação e condução do experimento

O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições. As unidades experimentais foram constituídas de 5 linhas de semeadura de 5 metros, espaçadas em 0,45 metros, perfazendo uma área de 11,25 m², enquanto que a parcela útil foi composta das três linhas centrais, descartando 0,5 metros em cada extremidade, totalizando-se 5,75 m². A densidade de semeadura foi de 14 sementes por metro.

Os tratamentos utilizados para o experimento com o óleo essencial de capim-limão encontram-

se na Tabela 1 e os tratamentos para o experimento com o óleo essencial de alecrim encontram-se na Tabela 2. Os tratamentos alternativos (óleo essencial e ASM) foram aplicados de forma preventiva e nos estádios R1, R2 e R3. Para o tratamento com azoxistrobina + ciproconazole foi realizada aplicação preventiva e em R3. Todas as aplicações foram realizadas utilizando um pulverizador costal pressurizado à CO₂, equipado com barra de 2 m e 4 bicos Jacto[®] tipo cone vazio J5-2 (disco J5, diâmetro externo 15 mm) e velocidade de deslocamento de 3,6 km h⁻¹ e volume de calda de 200 litros ha⁻¹. Os tratos culturais para a área do ensaio foram realizados conforme a necessidade e seguindo as recomendações para a cultura da soja.

Tabela 1 – Tratamentos utilizados no experimento 1 (Efeito do óleo essencial de capim-limão no manejo do oídio da soja) (Guarapuava-PR, 2013/14).

Tratamento	Concentração	Época de aplicação
Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	1000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	2000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	4000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	8000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Acibenzolar-S-Metil (ASM)	200 mg p.c. L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Azoxistrobina + ciproconazole	0,3 L p.c. ha ⁻¹	V9, R3
Controle	-	-

Tabela 2 – Tratamentos utilizados no experimento 2 (Efeito do óleo essencial de alecrim no manejo do oídio da soja) (Guarapuava-PR, 2013/14).

Tratamento	Concentração	Época de aplicação
Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	1000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	2000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	4000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	8000 µL L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Acibenzolar-S-Metil (ASM)	200 mg p.c. L ⁻¹	V9, R1, R2, R3
Azoxistrobina + ciproconazole	0,3 L p.c. ha ⁻¹	V9, R3
Controle	-	-

2.4. Avaliação da doença

Foram realizadas, em cada parcela, cinco avaliações para quantificação do óídio, tomando-se 10 plantas ao acaso por parcela e atribuindo valores de severidade nos folíolos obtidos nos terços superior, médio e inferior seguindo a escala diagramática (Anexo 3) proposta por Mattiuzzi (2003). Foi calculada a AACPD* (área abaixo da curva de progresso da doença) pela metodologia de Campbell e Madden (1990) utilizando os valores de severidade das cinco avaliações na fórmula abaixo:

$$*AACPD = \sum [(y_i + y_{i+1})/2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

onde:

y_i = severidade inicial da doença

y_{i+1} = severidade final da doença

$t_{i+1} - t_i$ = intervalo de tempo entre as leituras inicial e final

A avaliação da desfolha foi feita visualmente considerando a porcentagem da desfolha na planta. Esta avaliação ocorreu no estádio R6.

2.5. Análise enzimática

Discos de folhas foram coletados de cada parcela, acondicionados em papel alumínio e armazenados em freezer, para posterior análise das enzimas superóxido dismutase e peroxidase. As coletas foram baseadas nas épocas de aplicação e são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Época das coletas dos discos foliares de soja. Guarapuava, 2013.

Coleta	Época
Primeira coleta	24 horas após a primeira aplicação
Segunda coleta	24 horas antes da segunda aplicação
Terceira coleta	24 horas após a segunda aplicação
Quarta coleta	24 horas antes da terceira aplicação
Quinta coleta	24 horas após a terceira aplicação
Sexta coleta	24 horas antes da quarta aplicação
Sétima coleta	24 horas após a quarta aplicação

2.6. Determinação de proteínas

Em béquer de 250 mL colocou-se 0,0615 g do corante Azul de Coomassie Brillante G-250 e 50 mL de etanol 95%, mexeu-se com bastão de vidro até dissolver totalmente. Posteriormente adicionou lentamente 100 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e completou-se o volume de 1000 mL com água destilada. Filtrou-se, a vácuo, até que a absorvância apresentasse resultado entre 0,2 e 0,3 no espectrofotômetro a 595 nm e foi armazenado em frasco âmbar identificado em geladeira. Durante toda a reação os materiais encontravam-se sobre gelo em escama para manutenção da temperatura e evitar degradação do material. Em tubos de ensaio foram adicionados 50 μ L do extrato enzimático mais 2,5 mL do reagente Bradford, esses foram agitados em um agitador de tubos tipo vortex. Após 5 minutos foram efetuadas leituras em espectrofotômetro a 595 nm. A média da duplicata de cada amostra foi utilizada na equação da reta padrão de albumina bovina 50 mg, onde o resultado foi expresso em μ g de proteína mL^{-1} , e foi transformado para mg de proteína mL^{-1} para quantificação da atividade enzimática (BRADFORD, 1976).

2.7. Extrato enzimático

Primeiramente preparou-se 100 mL de solução estoque de fosfato de potássio monobásico 1 M, sendo utilizado 13,61 g de KH_2PO_4 e então completou-se o volume para 100 mL com água destilada; preparou-se também a solução estoque de fosfato de potássio dibásico 1 M, utilizando 22,83 g de K_2HPO_4 e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Com as soluções estoques preparadas, combinou 61,5 mL da solução estoque de fosfato de potássio dibásico com 38,5 mL da solução estoque de potássio monobásico, completou o volume final para 1000 mL com água destilada, a fim de se obter o tampão fosfato de potássio 0,1 M; posteriormente o pH foi ajustado para 7,0, com as soluções estoques, e por fim adicionou 0,037 g de EDTA.

O material vegetal armazenado anteriormente foi macerado em nitrogênio líquido em almofaziz previamente resfriado com nitrogênio líquido, adicionando-se polivinilpirolidona (1% do peso do material vegetal utilizado) e tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) na proporção de 4 mL g^{-1} material vegetal. A suspensão vegetal foi colocada em tubos para microcentrífuga e centrifugada a 15000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em freezer

para posterior determinação da atividade enzimática (KAR e MISHRA, 1976).

2.8. Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7)

O substrato enzimático foi preparado adicionando 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio e completou o volume para 100 mL com tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), misturou-se em agitador magnético e foi mantida em banho-maria a 30°C. Para a determinação da atividade da peroxidase, adicionou-se 100 µL do extrato enzimático (LUSSO e PASCHOLATI, 1999) seguido de 2900 µL do substrato enzimático na cubeta que já se encontrava dentro do espectrofotômetro e imediatamente fechou-se este. A leitura foi realizada a cada 10 segundos por dois minutos a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.9. Atividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

O meio de reação foi preparado no momento da análise e no escuro. Para o preparo de 250 mL do meio de reação misturou-se na seguinte ordem: 125 mL de tampão fosfato de potássio 0,105 M pH 7,8; 250 µL de EDTA 0,1 mM; 15 mg de NBT; 13 mL de metionina 0,25 M pH 7,8; 50 µL de riboflavina 0,01 M e completar o volume de 250 mL com água destilada (GIANNOPOLITIS e REIS, 1977).

Diferentes volumes do extrato enzimático foram analisados para os diferentes materiais vegetais. Optou-se então que a reação fosse feita com um volume de 20 µL do extrato enzimático. Placas de cultivo de células com 24 poços e fundo chato com capacidade máxima de 3,5 mL foram utilizadas para a reação. O extrato enzimático foi colocado nos poços e adicionou-se 3 mL de meio de reação, o controle da reação foi obtido pela adição do meio de reação sem a adição do extrato enzimático nos poços. A reação iniciou-se com o ascender da luz (15 W), após 10 minutos desligou-se a luz, paralisando a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm.

Para o cálculo da atividade da SOD utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da SOD (U } \mu\text{g de proteína}^{-1}\text{)} = \frac{\% \text{ inibição} \times \text{vol da amostra (}\mu\text{L)}}{50 \% \times \text{concentração de proteína (}\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}\text{)}}$$

Sendo que 1 unidade de SOD representa 50 % de inibição da fotorredução do NBT (GIANNOPOLITIS e REIS, 1977).

2.10. Trocas gasosas

Para as avaliações das trocas gasosas foram mensuradas a taxa de assimilação de CO₂ (A) ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E) ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (C_i). A partir destes dados, foram quantificadas a eficiência no uso de água (EUA) (A/E) [$(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}$] e a eficiência instantânea da carboxilação (E_iC) (A/C_i) [$(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}$]. Utilizou-se o analisador de gás infravermelho IRGA (LI-6400, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Procedeu-se às aferições das respectivas variáveis, em R1, 24 h antes da 2ª aplicação, adotando-se, como critério, a última folha totalmente expandida, no ápice do ramo principal.

2.11. Análise dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), e análise de regressão apenas para as concentrações dos óleos essenciais, utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1: óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no manejo do oídio da soja

As concentrações do óleo essencial de capim-limão apresentaram efeito quadrático em relação a AACPD de oídio, sendo significativamente semelhante ao indutor estudado (ASM), além disso, apresentaram menor AACPD do que a testemunha, entretanto maior do que o tratamento convencional (azoxistrobina + ciproconazole) (Figura 5A).

Em relação à desfolha, o óleo essencial de capim-limão apresentou efeito linear negativo, sendo que a concentração de 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi semelhante estatisticamente ao controle convencional, apresentando desfolha de 17,09 % a menos que a testemunha (Figura 5B).

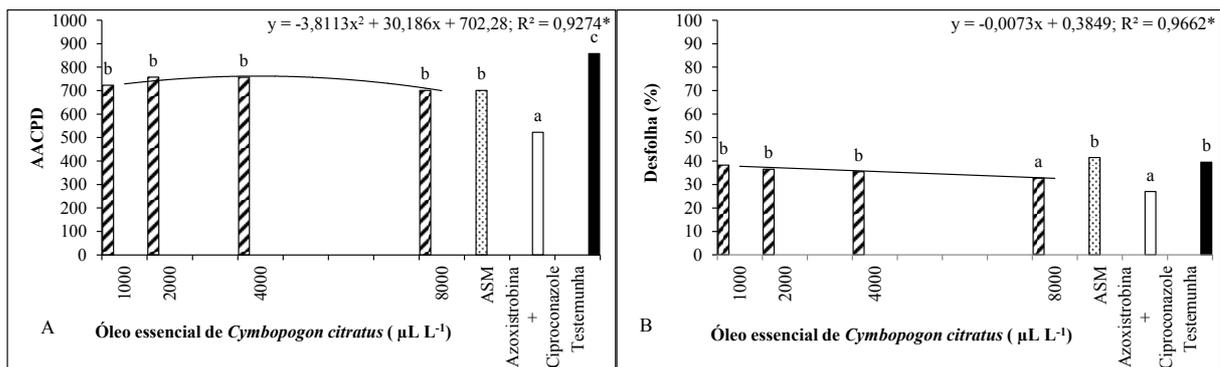


Figura 5. Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na Área Abaixo da Curva do Progresso da doença (AACPD) de oídio (A), e porcentagem de desfolha em R6 (B) na cultura da soja. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Para número de vagens e número de grãos por planta, houve efeito quadrático em função das concentrações do óleo essencial, a concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou maiores valores para ambas as variáveis, sendo semelhante estatisticamente ao tratamento convencional (Figura 6A e B). Para peso de mil grãos, o óleo essencial apresentou efeito quadrático em função das concentrações, entretanto apresentaram menores pesos que os demais tratamentos (Figura 6C).

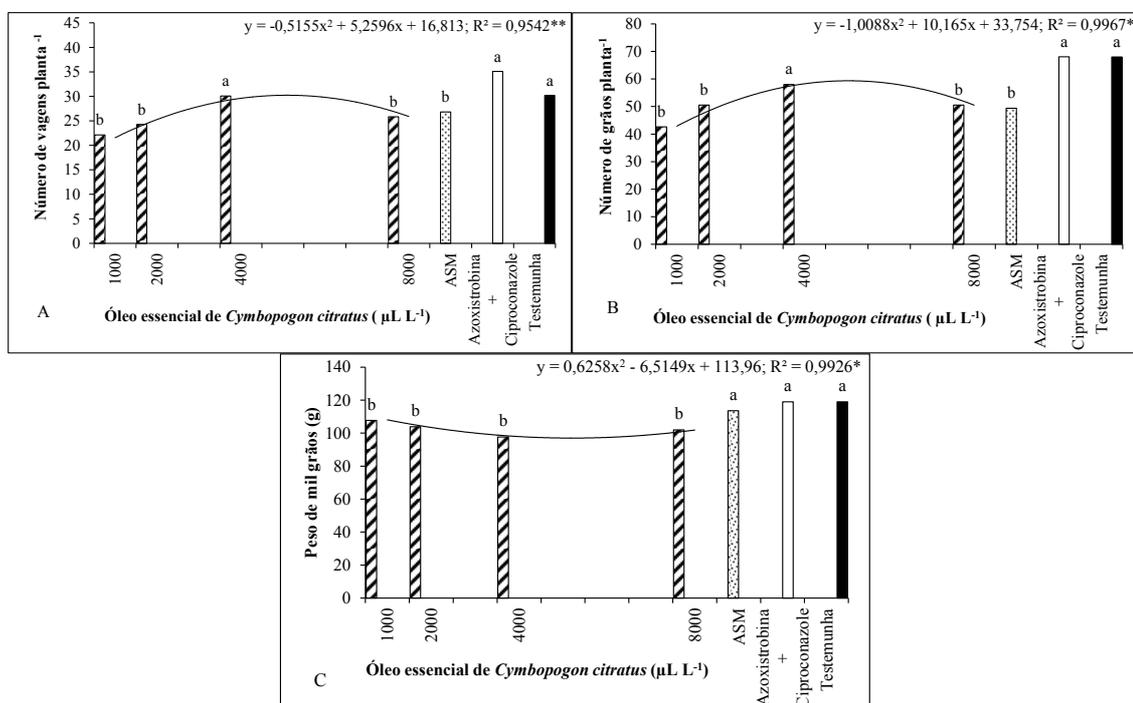


Figura 6. Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no número de vagens planta⁻¹ (A), no número de grãos planta⁻¹ (B) e peso de mil grãos (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Para a atividade da superóxido dismutase (SOD) o óleo essencial de capim-limão apresentou efeito linear positivo, no entanto, a atividade da SOD na primeira coleta foi menor do que a testemunha e o controle convencional, sendo similar ao ASM (Figura 7 A). Na terceira, quinta e sétima coletas apresentaram efeito quadrático em relação à atividade da enzima (Figura 7 B e C), sendo que a concentração de 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ na terceira coleta apresentou maior atividade enzimática quando comparada com a testemunha, não diferindo dos tratamentos ASM e azoxistrobina + ciproconazole (Figura 7 B). Na quinta coleta, todos os tratamentos mostraram menor atividade do que a testemunha (Figura 7 C), e não houve diferença entre os tratamentos na sétima coleta. Nas coletas realizadas antes das aplicações, os tratamentos não apresentaram diferença estatística (dados não mostrados).

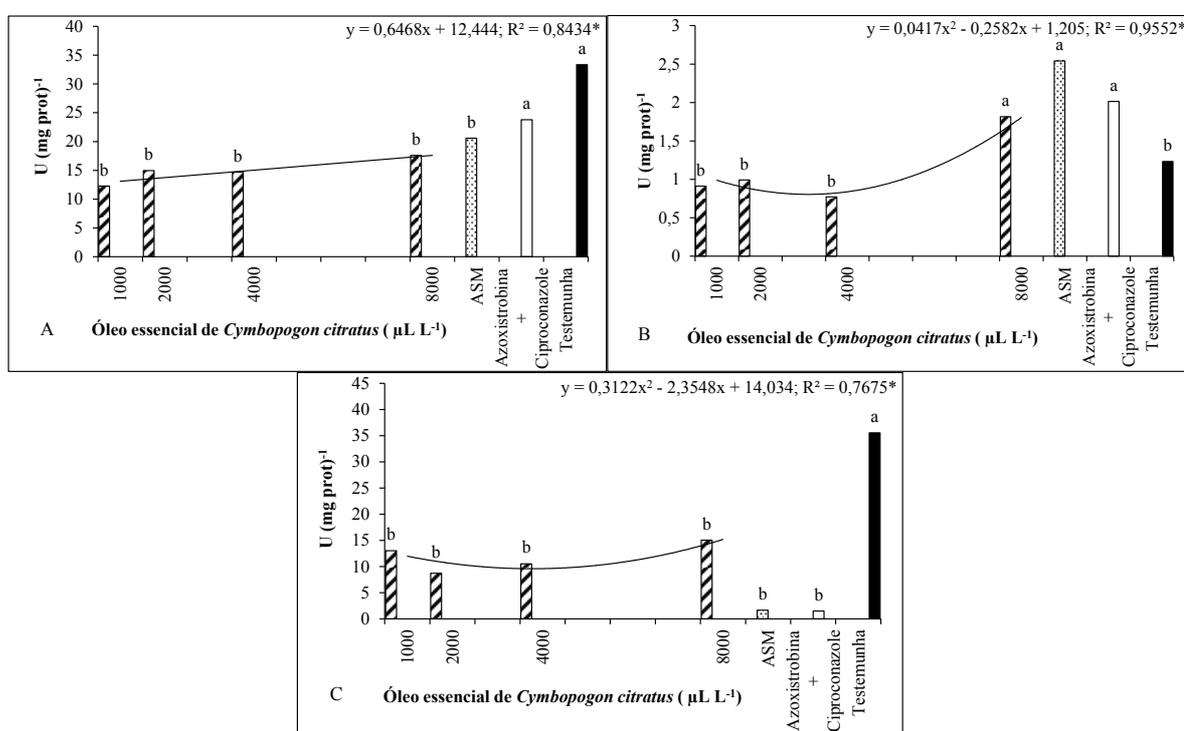


Figura 7. Atividade da superóxido dismutase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. A = 24 horas após a primeira aplicação (primeira coleta); B = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); C = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Após 24 horas da segunda aplicação e 24 horas antes da terceira aplicação o óleo essencial de capim-limão apresentou efeito quadrático em relação à atividade da enzima peroxidase (Figura 8A e B), sendo que o óleo essencial 24 horas após a segunda aplicação apresentou maior atividade enzimática quando comparada com a testemunha, tratamentos ASM e azoxistrobina + ciproconazole (Figura 8A). Na quarta coleta, a concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou maior atividade enzimática que os demais

tratamentos (Figura 8B). O óleo essencial apresentou efeito linear negativo na quinta coleta, no entanto, as concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ proporcionaram maior atividade enzimática (Figura 8C). Na sétima coleta, não foi observado efeito significativo de regressão no óleo essencial, entretanto, a concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou maior atividade da peroxidase que os demais tratamentos (Figura 8D). Para as demais coletas não houve diferença significativa entre os tratamentos.

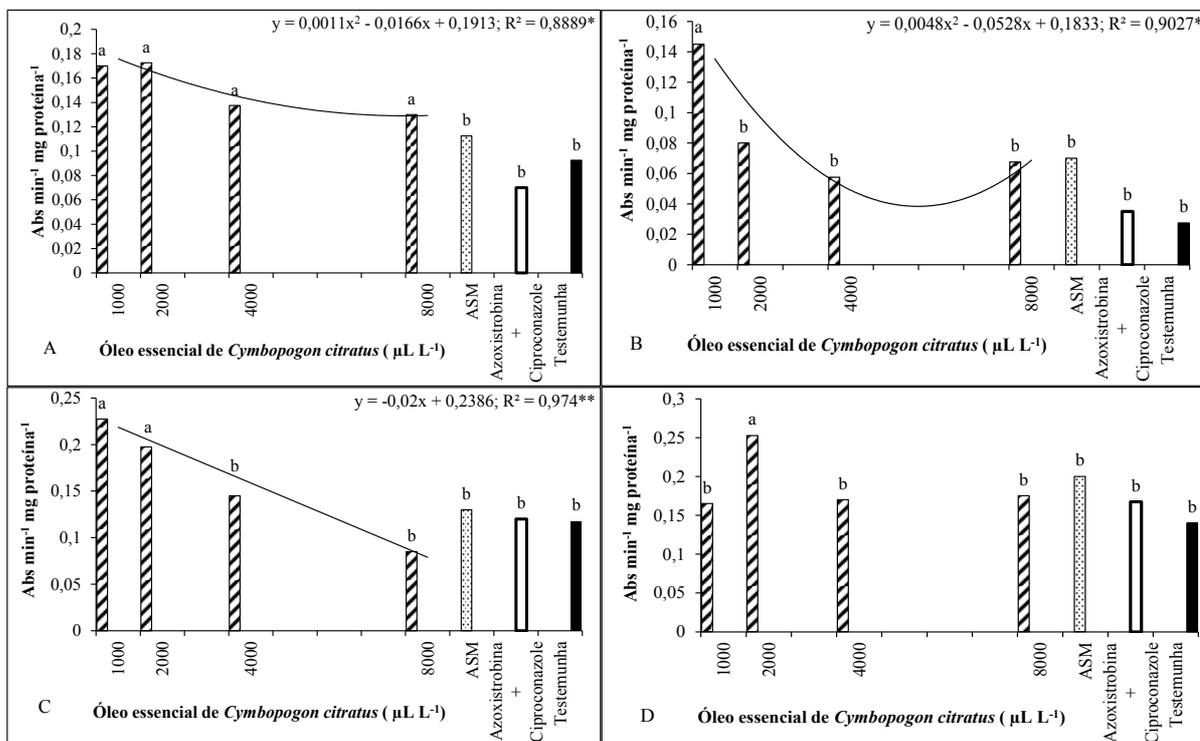


Figura 8. Atividade da peroxidase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. A = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); B = 24 horas antes da terceira aplicação (quarta coleta); C = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta) e D = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Em relação às trocas gasosas, as concentrações de 4000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial e o tratamento com ASM foram os tratamentos que apresentaram maior fotossíntese líquida (taxa de assimilação de CO_2), maior eficiência do uso da água e melhor atividade da Rubisco (eficiência instantânea de carboxilação). Já a concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ mostrou-se inversamente as demais concentrações (Figura 9 A, E e F). Na testemunha é possível observar uma queda na taxa de assimilação de CO_2 , na eficiência do uso da água e na atividade da Rubisco (Figura 9 A, E e F), associado a baixa atividade da POX (Figura 8 A) e a alta atividade da SOD (Figura 7 A).

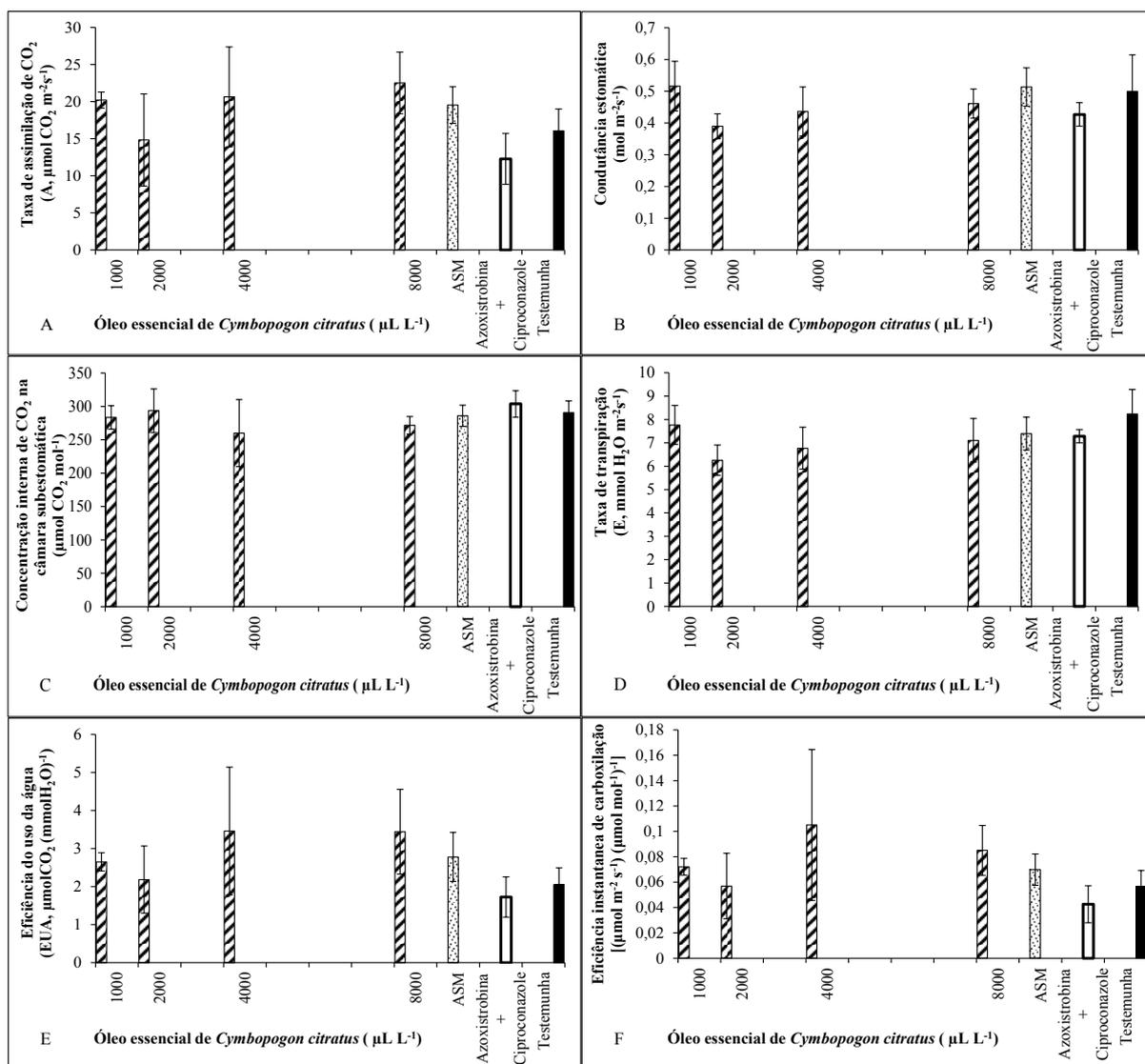


Figura 9. Trocas gasosas em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, 6 dias após a primeira aplicação. A =Taxa de assimilação de CO₂ (A, µmol CO₂ m⁻²s⁻¹); B = Condutância estomática (mol m⁻²s⁻¹); C = Concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (µmol CO₂ mol⁻¹); D =Taxa de transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹); E = Eficiência do uso da água (EUA, µmolCO₂ (mmolH₂O)⁻¹); e F = Eficiência instantânea de carboxilação [(µmol m⁻² s⁻¹) (µmol mol⁻¹)⁻¹]. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 29/01/2014).

3.2. Experimento 2: óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* no manejo de doenças da soja

O óleo essencial de alecrim apresentou efeito quadrático em relação a AACPD de oídio, entretanto, não diferiram da testemunha (Figura 10A). A concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou menor porcentagem de desfolha que os demais tratamentos, promovendo uma redução de 23% de desfolha em relação ao controle (Figura 10B).

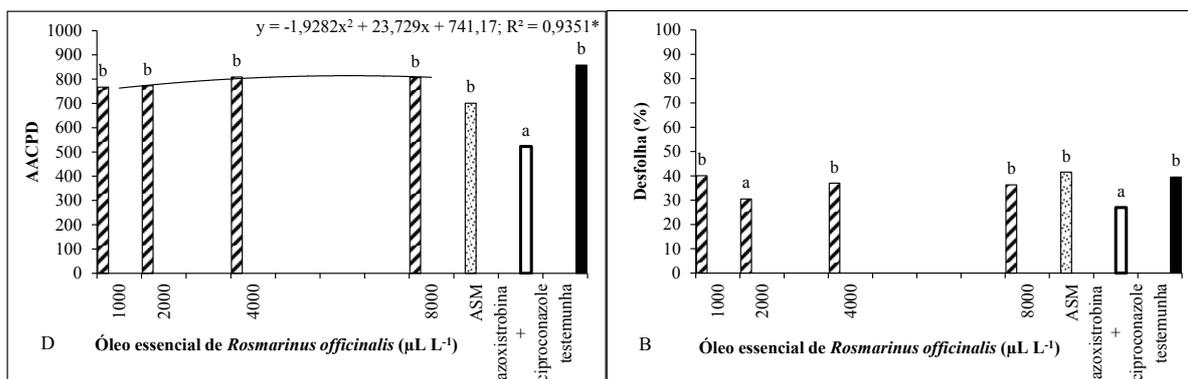


Figura 10. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* na Área Abaixo da Curva do Progresso da doença (AACPD) de oídio (A), e porcentagem de desfolha em R6 (B) na cultura da soja. Análise de regressão apenas para as concentrações do óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Em relação ao número de vagens e número de grãos por planta houve efeito quadrático em função da concentração do óleo essencial, sendo que a concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou maiores valores não diferindo do controle convencional e da testemunha (Figura 11A e B). Os tratamentos com óleo essencial apresentaram menor peso de mil grãos que os demais tratamentos (Figura 11C).

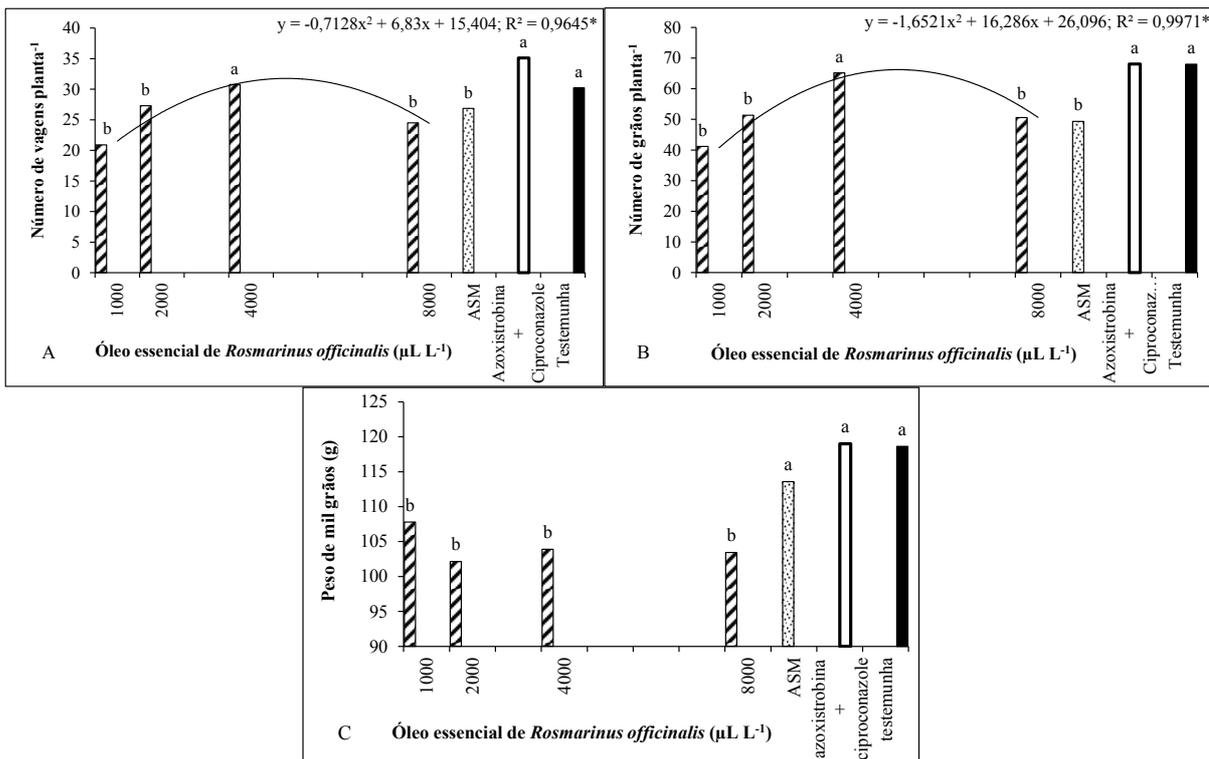


Figura 11. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* no número de vagens planta⁻¹ (A); no número de grãos planta⁻¹ (B) e no peso de mil grãos (C). Análise de regressão apenas para as concentrações do óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

O óleo essencial de alecrim apresentou efeito quadrático, em relação a atividade da superóxido dismutase, em todas as coletas, exceto na quarta coleta (24 horas antes da terceira aplicação) que não houve efeito significativo (Figura 12A, B, C, D, E e F). Na segunda coleta, a concentração de 1000 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram maior atividade enzimática, entretanto não diferiram do controle convencional e testemunha (Figura 12B). Na quinta coleta e sétima, a concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou atividade enzimática maior que os demais tratamentos, excetuando a testemunha na quinta coleta (Figura 12D e F). Somente na sexta coleta que a concentração de 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou atividade enzimática maior que os demais tratamentos, não diferindo do tratamento com azoxistrobina + ciproconazole e testemunha (Figura 12E). Não houve diferença significativa entre os tratamentos na terceira coleta. Em algumas coletas a atividade da SOD foi inferior ou não houve diferença significativa em relação à testemunha (Figura 12A, B, C, D e E).

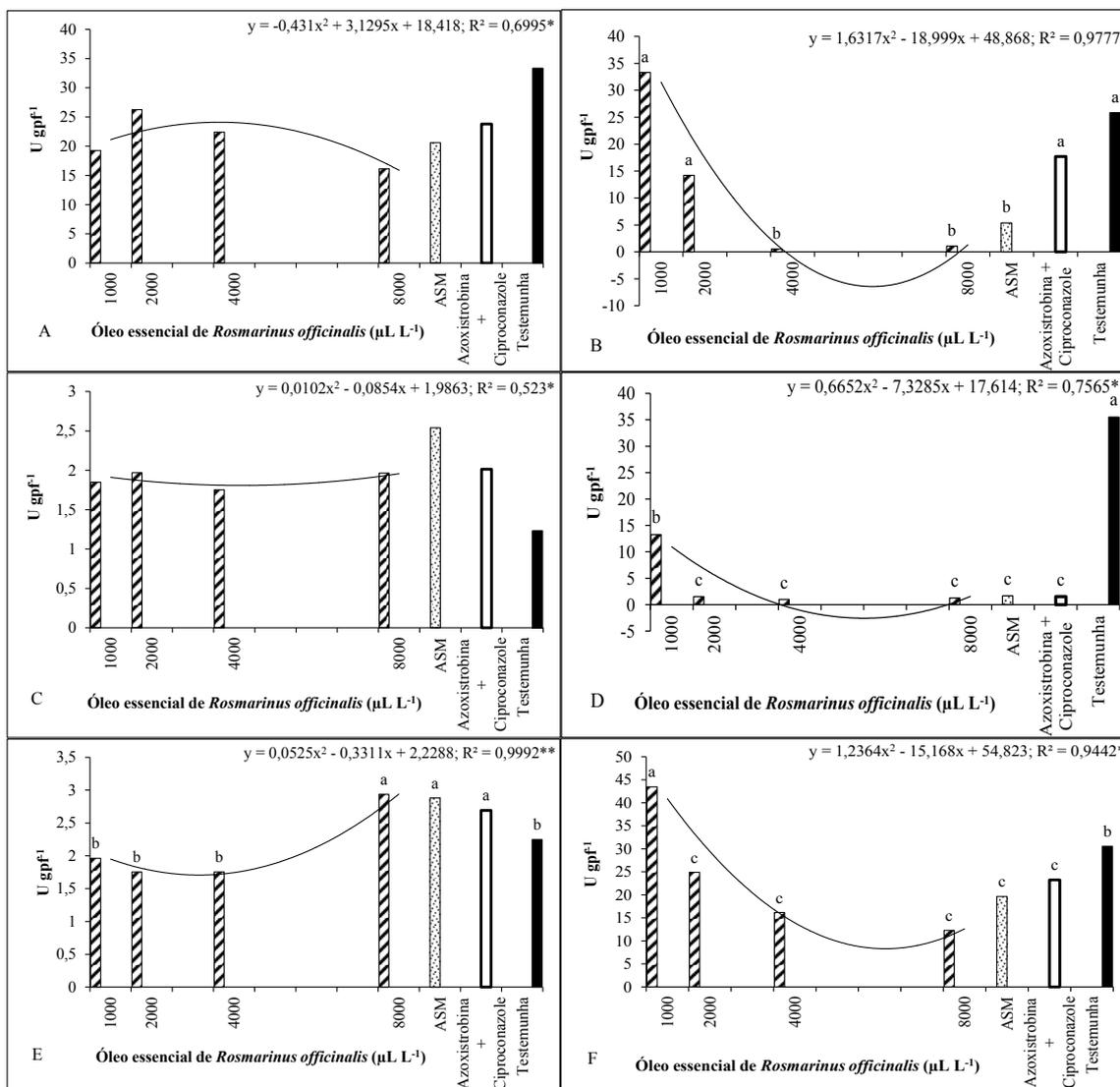


Figura 12. Atividade da superóxido dismutase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. A = 24 horas após a primeira aplicação (primeira coleta); B = 24 horas antes da segunda aplicação (segunda coleta); C = 24 horas após a segunda aplicação (terceira coleta); D = 24 horas após a terceira aplicação (quinta coleta); E = 24 horas antes da quarta aplicação (sexta coleta) e F = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

Em relação à atividade da peroxidase em função das concentrações do óleo essencial, houve efeito linear negativo na quarta coleta (Figura 13A) e efeito quadrático na sexta e sétima coleta (Figura 13B e C). Na quarta coleta o óleo essencial não diferiu do ASM e

apresentaram maior atividade enzimática que o controle convencional e testemunha (Figura 13A), enquanto que na sexta coleta, somente as concentrações de 4000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram atividade superior aos demais tratamentos (Figura 13B), e na sétima coleta não houve diferença significativa entre os tratamentos.

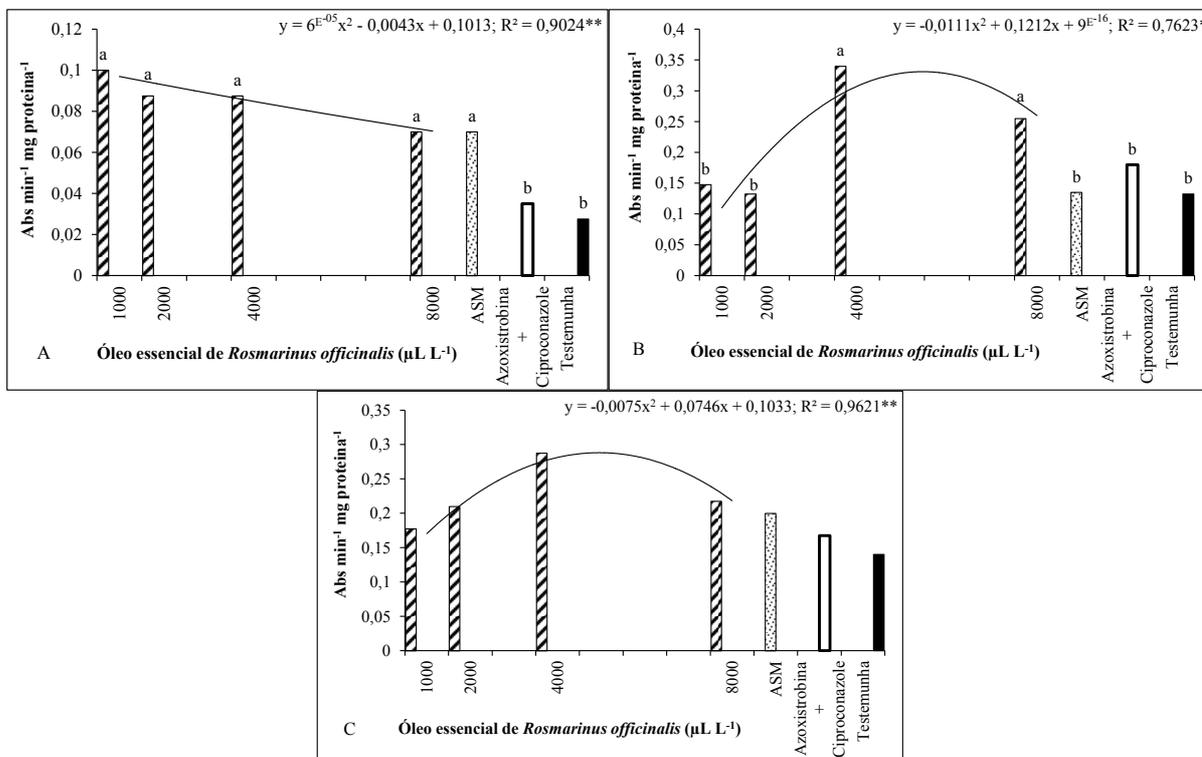


Figura 13. Atividade da peroxidase em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. A= 24 horas antes da terceira aplicação (quarta coleta); B = 24 horas antes da quarta aplicação (sexta coleta) e C = 24 horas após a quarta aplicação (sétima coleta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 2014).

As concentrações de 2000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ e o tratamento com ASM apresentaram maior taxa de assimilação de CO_2 , maior eficiência do uso da água e maior eficiência de carboxilação (Figura 14A, E e F). Já a concentração de 1000 e 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ mostraram-se inversamente as outras concentrações, entretanto apresentavam alta concentração interna de CO_2 e condutância estomática similar a concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 14B e C). Apesar de a testemunha apresentar um taxa de assimilação de CO_2 relativamente semelhante aos melhores tratamentos (Figura 14A), ela mostrou uma baixa eficiência do uso da água e baixa atividade da Rubisco (Figura 14E e F).

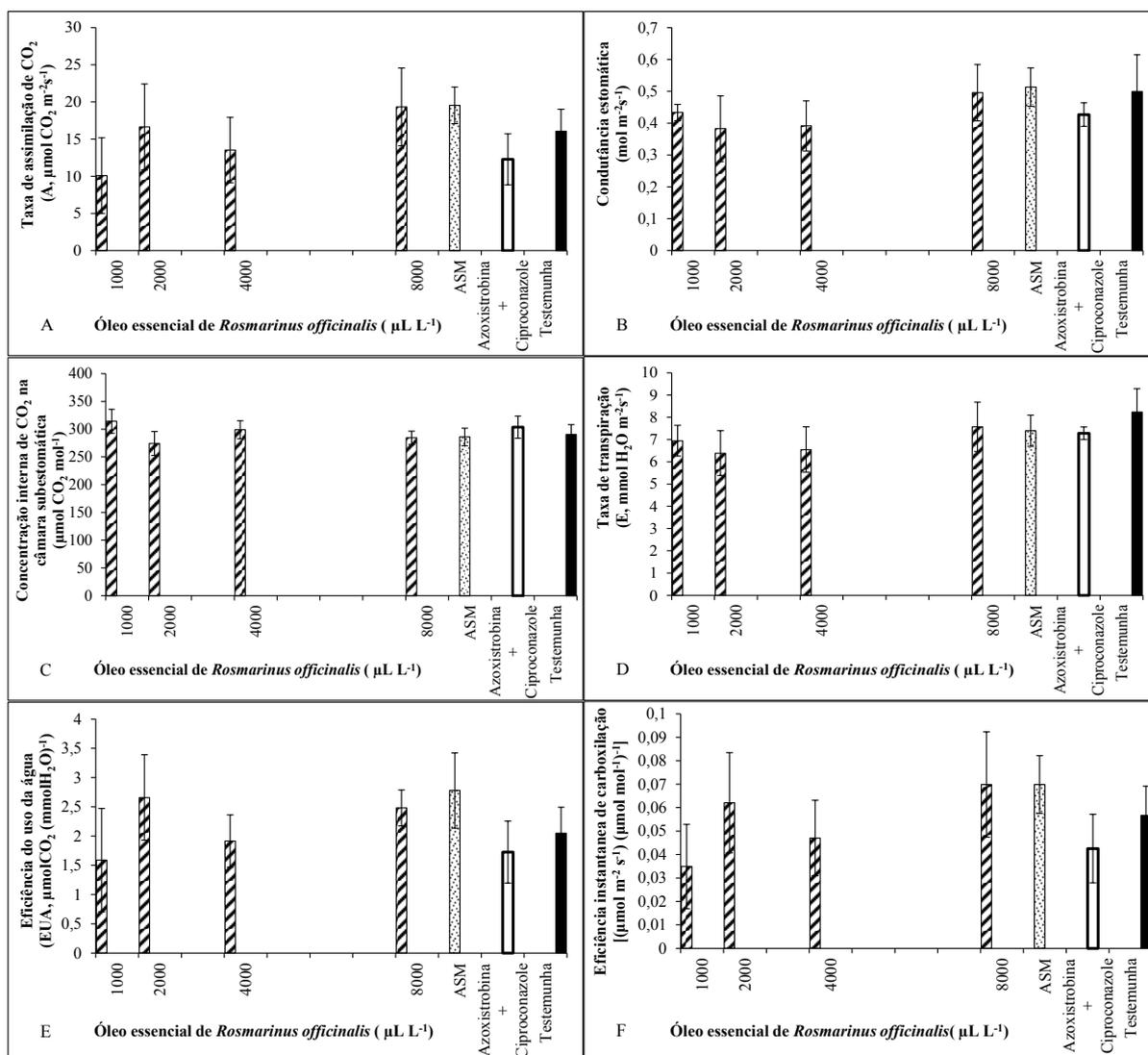


Figura 14. Trocas gasosas em folhas de soja submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, 6 dias após a primeira aplicação. A = Taxa de assimilação de CO₂ (A, μmol CO₂ m⁻²s⁻¹); B = Condutância estomática (mol m⁻²s⁻¹); C = Concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (μmol CO₂ mol⁻¹); D = Taxa de transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹); E = Eficiência do uso da água (EUA, μmolCO₂ (mmolH₂O)⁻¹); e F = Eficiência instantânea de carboxilação [(μmol m⁻² s⁻¹) (μmol mol⁻¹)⁻¹]. ASM, Acibenzolar-S-Metil (Guarapuava-PR, 29/01/2014).

4. DISCUSSÃO

A ocorrência de oídio na cultura da soja foi favorecida pelas condições ambientais (Apêndice 1) durante o desenvolvimento do experimento, que condiz com Reis (2004) que afirma que as condições ideais para o desenvolvimento da doença são a baixa umidade do ar e temperaturas amenas (18-22°C). A redução da AACPD como observada no experimento 1, utilizando óleo essencial de capim-limão, também foi notada por outros autores como Carnelossi et al. (2009) ao avaliarem, *in vitro* e *in vivo*, o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* (agente causal da antracnose do mamão) por óleos essenciais de capim-limão, eucalipto, menta e estragão verificaram a eficiência antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão, observada em frutos de mamão tratados com 1% desse óleo, os quais apresentavam menor área abaixo da curva de progresso da antracnose do mamão. E também por Sarmiento-Brum et al. (2013) que avaliaram a fungitoxicidade *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de capim-limão, citronela, erva-cidreira, hortelã-pimenta e nim (este último apenas no ensaio *in vivo*) sobre o fungo *Colletotrichum graminicola* (agente causal da antracnose do sorgo) e verificaram que o óleo essencial de capim-limão foi um dos mais eficientes na redução do crescimento micelial do fungo, além de reduzir a severidade da antracnose tanto de forma preventiva quanto curativa.

Assim também, Itako et al. (2009) avaliaram a fungitoxicidade *in vitro* dos extratos brutosaquosos de mil folhas, cânfora, capim-limão e alecrim contra *Cladosporium fulvum* e o efeito protetor destes extratos para a cladosporiose em plantas de tomateiro em casa-de-vegetação, os autores verificaram, *in vivo*, uma redução no número de lesões e uma possível indução de resistência pelos extratos brutos aquosos, principalmente para cânfora e alecrim. Vigo et al. (2009) estudando o efeito de tinturas de erva cidreira, alecrim pimenta, guaco, cavalinha e hera e de óleos essenciais de alecrim e canela sobre o crestamento bacteriano comum de feijoeiro, não constataram diferença significativa entre o óleo essencial de alecrim e a testemunha, assim como observado no experimento 2.

A redução do peso e da produção observada em ambos os experimentos, possivelmente, se deve ao fato dos recursos para o crescimento e defesa serem os mesmos, o que promove um desvio da energia e dos fotoassimilados para o processo de indução de resistência para a planta e redução dos recursos da planta para o crescimento (GAYLER et al., 2004).

O aumento da atividade da SOD resulta no aumento da concentração de H_2O_2 , o qual pode agir como sinalizador nas respostas de defesa em plantas, reforçando a parede celular por meio das ligações cruzadas das proteínas estruturais. A SOD é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante dismutando o O_2^- a H_2O_2 (PASCHOLATI et al., 2008). No presente trabalho, o aumento da atividade enzimática utilizando o óleo essencial de capim-limão foi observado somente 24 horas após a segunda aplicação, enquanto que utilizando o óleo essencial de alecrim a atividade da SOD foi inferior ou não houve diferença significativa em relação à testemunha. Esse fato ocorre devido à rápida formação das EROS no início do processo infeccioso ou mesmo um eliciador, também conhecida como explosão oxidativa (PEREIRA et al., 2008).

O aumento da atividade da peroxidase observada em ambos os experimentos é um indicativo da indução de resistência. As peroxidases são enzimas com função dupla, pois conseguem gerar o H_2O_2 que lhes servirá de substrato e possuem grande afinidade por parede e outros componentes celulares, podendo, durante o processo de lignificação, ficar aderidas à parede celular ou à membrana envolvida na síntese da lignina (PASCHOLATI et al., 2008). A atividade da enzima está correlacionada com a ocorrência de infecção por patógenos, ela participa no processo de defesa, catalisando a oxirredução do H_2O_2 convertendo-o em água na presença de um substrato (STANGARLIN et al., 2011), além de reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (ITAKO, 2008). A falta de diferença significativa entre os tratamentos, na última coleta utilizando o óleo essencial de alecrim, possivelmente está relacionada com o estágio das plantas, semelhante aos resultados de Vigo et al. (2009), que não observaram diferença na produção de peroxidase pelos óleos essenciais de alecrim e canela sobre o cretamento bacteriano comum de feijoeiro.

A concentração de $2000\mu L L^{-1}$ do óleo essencial de capim-limão apresentou efeito diferente das demais concentrações, possivelmente pelo fato devido à atividade da SOD e da POX estar um pouco mais elevada nessa concentração. Uma das características da indução de resistência é a ausência do efeito de dose, entretanto, há a necessidade de uma dosagem mínima do agente indutor para desencadear o início da reação (MACAGNAN et al., 2008). Portanto, as concentrações mais baixas do óleo essencial de capim-limão (1000 e $2000\mu L L^{-1}$) e do óleo essencial de alecrim (1000 , 2000 e $4000\mu L L^{-1}$), podem ter sido inferiores às dosagens necessárias para desencadear as respostas de defesa.

A queda na taxa de assimilação de CO₂, na eficiência do uso da água e na eficiência instantânea de carboxilação, podem estar associadas a alta severidade do oídio, que se desenvolve em toda a parte aérea, formando uma fina cobertura esbranquiçada constituída de micélio e esporos pulverulentos, interferindo na interceptação da radiação solar, conseqüentemente, reduzindo a fotossíntese (IGARASHI et al., 2010). A fotossíntese é um processo primordial para todos os organismos vivos, em que os organismos fotossintetizantes captam a energia solar para gerar ATP e NADPH, posteriormente usados como fonte energética para a síntese de carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de CO₂ e H₂O, liberando, concomitantemente, O₂ na atmosfera (PASCHOLATI et al., 2008).

Pimentel e Perez (2000) afirmam que em folhas iluminadas, a resistência estomática pode ter interferência de vários fatores ambientais como temperatura do ar, déficit de pressão do vapor, concentração de CO₂ e potencial hídrico no solo, além disso, o aumento da radiação solar associado com a redução do potencial hídrico no solo pode aumentar a resistência estomática. Na cultura da soja, a radiação solar influencia a taxa fotossintética, alongação da haste principal e ramificações, expansão foliar, pegamento de vagens e grãos e fixação biológica do N. Uma maior eficiência no uso da radiação solar é importante para o rendimento da cultura da soja, principalmente durante o período de enchimento de grãos (SILVA e SAMPAIO, 2012).

Os tratamentos ASM, 4000 e 8000 µL L⁻¹ do óleo essencial de capim-limão aumentaram a taxa de assimilação de CO₂, a eficiência do uso da água, a atividade da Rubisco (estimada pela eficiência instantânea de carboxilação) e a atividade da SOD e redução na atividade da POX e da AACPD oídio. Esses dados se devem ao fato das concentrações do óleo essencial de capim-limão induzirem a resistência nas plantas de soja, reduzindo a severidade do oídio e, conseqüentemente reduzindo a interferência dos sintomas/sinais do fungo na interceptação da radiação solar. Efeito contrário do observado no tratamento com 2000 µL L⁻¹ do óleo essencial de capim-limão e no controle, que apresentaram redução da taxa de assimilação de CO₂, da eficiência do uso da água, da atividade da Rubisco e da atividade da POX e aumento na atividade da SOD e da AACPD oídio. Possivelmente a concentração não foi suficiente para desencadear o início da indução de resistência, logo não reduzindo a severidade do oídio, isso porque a área fotossinteticamente ativa apresentava as estruturas do fungo que reduziam a interceptação da radiação solar, conseqüentemente reduzindo a fotossíntese (IGARASHI et al., 2010; MACAGNAN et al., 2008).

Os tratamentos ASM, 2000 e 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de alecrim apresentaram aumento na taxa de assimilação de CO_2 , na eficiência do uso da água e na eficiência instantânea de carboxilação. A concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de alecrim ainda apresentou redução da atividade da SOD e aumento da POX, que reflete a indução de resistência, reduzindo o desenvolvimento do patógeno sem interferência na absorção da radiação solar. O controle também apresentou aumento na taxa de assimilação de CO_2 , entretanto, observou-se redução na eficiência do uso da água e na eficiência instantânea de carboxilação. Esses dados refletem o aumento da resistência estomática causado pela interferência de vários fatores ambientais como temperatura do ar, déficit de pressão do vapor, concentração de CO_2 e potencial hídrico no solo (PIMENTEL E PEREZ, 2000).

5. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de capim-limão e alecrim interferem no manejo de oídio da soja, sendo que o óleo essencial de capim-limão reduz a AACPD do oídio. Os dois óleos essenciais interferem nas respostas fisiológicas e nos mecanismos de resistência da cultura, demonstrando haver ainda especificidade quanto a concentração e forma de ação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Ed.). **Introduction to plant disease epidemiology**. NY: Wiley, New York, 532p., 1990.

CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil**.2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p.1039-1042, 2011.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, p. 898–904, 2007.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in Young Apple trees. **Trees**, Vancouver, v. 18, p. 363-371, 2004.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

IGARASHI, S.; OLIVEIRA, G.M.; CAMARGO, L.C.M.; FALKOSKI FILHO, J.;

GARDIANO, C.G.; BALAN, M.G. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.2, p.245-250, 2010.

ITAKO, A.T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR, 2008.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v. 76, n.1, p. 75-83, jan./mar., 2009.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 57, p. 315-319, 1976.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, Fev. 2008.

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*M. diffusa*) na produção e duração da área foliar sadia da soja**. 2003. 49p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2003.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba, ed. FEALQ, 627 p., 2008.

PEREIRA, D.G.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; REIS, M.S.; GOMES, J.L.L.; TEIXEIRA, R.C.; NOGUEIRA, A.P.O. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja avaliados para resistência ao oídio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1836-1842, 2008.

PIMENTEL, C., PEREZ, A.J.C. Estabelecimento de parâmetros para avaliação de tolerância à seca em genótipos de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.1, p.46-58, 2000.

REIS, E.M. **Doenças na Cultura da Soja**. Aldeia Norte Editora, Passo Fundo, 177 p., 2004.

SANTOS, H.G. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Embrapa, Brasília, 3ª ed., 2013.

SARMENTO-BRUM, R.B.C.; SANTOS, G.R.; CASTRO, H.G.; GONÇALVES, C.G.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; NASCIMENTO, I.R. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a antracnose do sorgo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1549-1557, 2013.

SILVA, I.C.; SAMPAIO, L.S. Curva de resposta da fotossíntese à irradiância em diferentes estádios fenológicos de soja. **Anais do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA**, Belém, resumo nº 715, 2012.

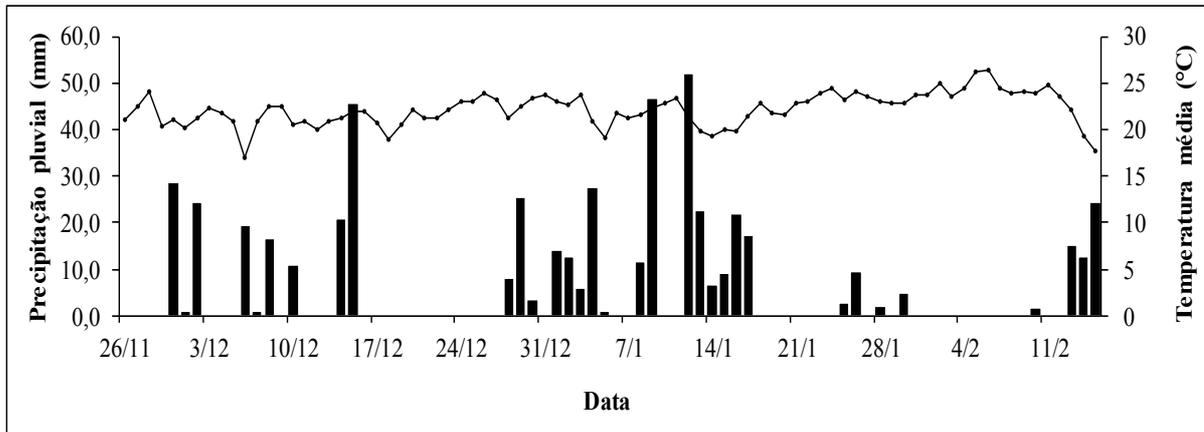
STANGARLIN, J. R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CÂMARA, R. de C.; LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, p.293-304, 2009.

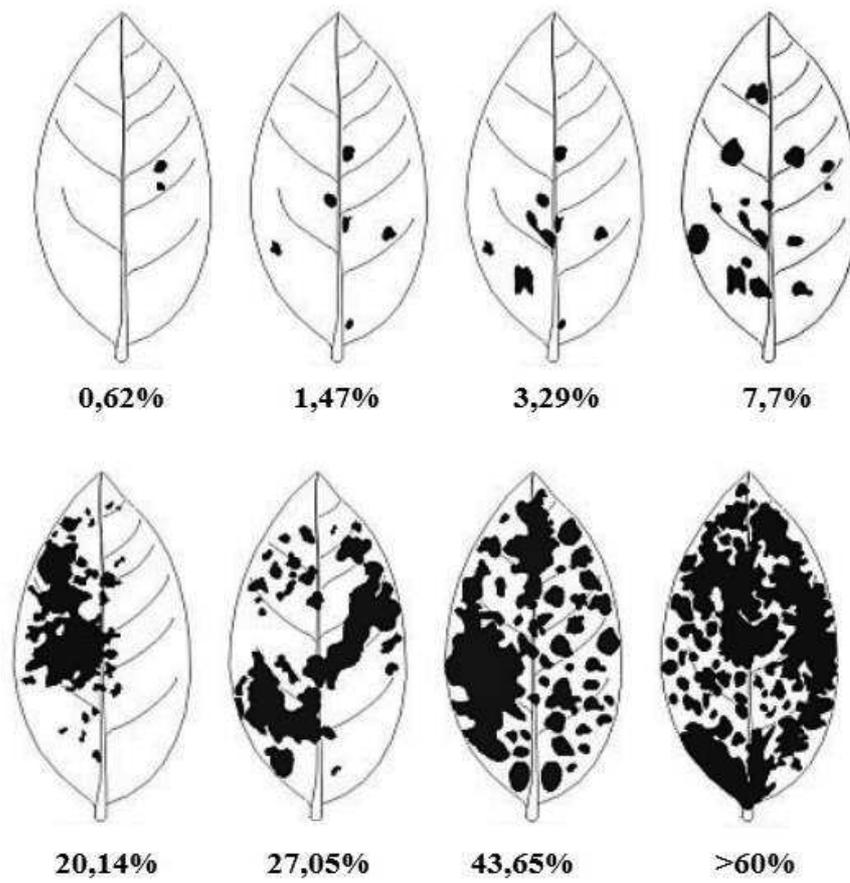
WORWOOD, S. **Aromaterapia**: um guia de A a Z para o uso terapêutico dos óleos essenciais. São Paulo: Best Seller, 251p., 1995.

APÊNDICE

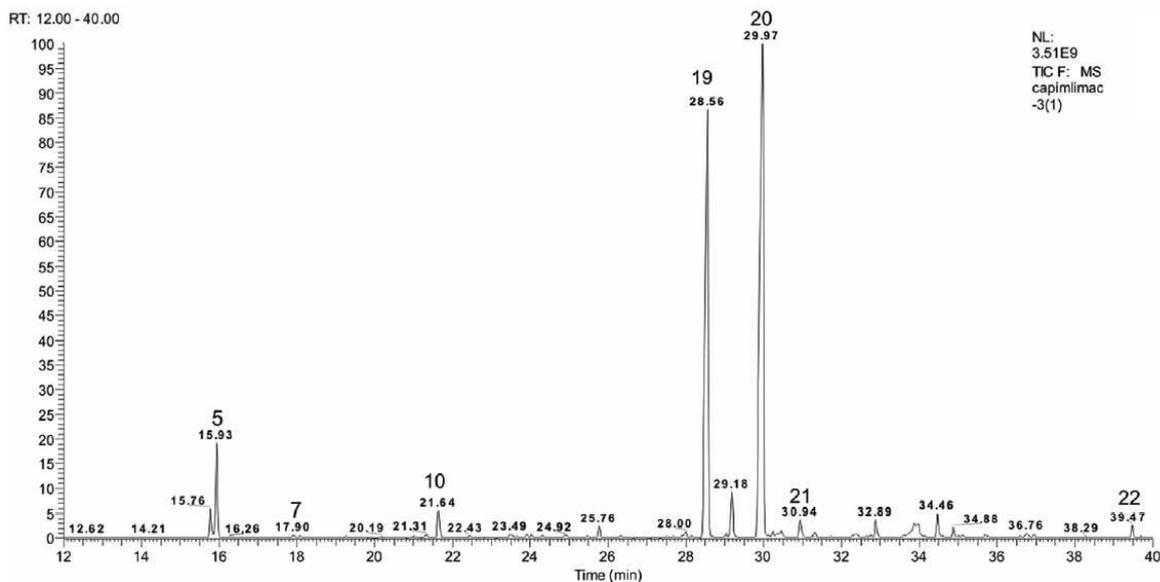
Apêndice 1 - Precipitação pluviométrica (mm) (colunas) e temperatura média do ar (°C) (linha) entre 26/11/2013 e 15/02/2014 em Guarapuava – PR



ANEXOS



Anexo 1 – Escala diagramática do oídio da soja (*M. diffusa*) (MATTIAZZI, 2003)



Anexo 2 - Análise cromatográfica expandida do óleo essencial de capim-limão, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Compostos: 5) β -mirceno, 7) 1,8 cineol (eucaliptol) 10) linalol 19) Nerol 20) Geraniol 21) 2-undecanona 22) 2-tridecanona (MAIA et al., 2014b)

Anexo 3 - Componentes do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), identificados por CG-EM, e seus respectivos teores expressos em normalização de área⁽¹⁾ (MAIA et al., 2014a).

Componentes	t _r (min)	IK	Teor (%)
α -pineno	12,72	930,94	12,00
Canfeno	13,40	943,46	4,08
β -pineno	14,91	971,27	3,03
1-octen-3-ol	15,58	983,61	0,13
β -mirceno	15,97	990,79	1,24
A-terpineno	17,17	1.013,36	0,44
1,8 cineol (eucaliptol)	18,10	1.031,11	44,39
γ -terpineno	19,45	1.056,87	0,47
Terpinoleno	20,94	1.085,31	0,24
Linalol	21,77	1.101,22	0,93
Cânfora	23,90	1.144,69	19,75
Borneol	24,85	1.164,08	3,22
Terpineno-4-ol	25,39	1.175,10	0,56
α -terpineol	26,14	1.190,41	2,33
Verbenona	26,92	1.203,46	0,07
Acetato de bornila	30,51	1.243,58	0,37
β -cariofileno	36,30	1.418,14	4,53
α -humeleno	37,63	1.450,74	0,38

⁽¹⁾CG-EM, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa; tr, tempo de retenção; IK, índices de retenção de Kovats.