

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**EXTRATOS VEGETAIS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁGAR-ÁGUA E SOLO**

CLÁUDIA DE SOUZA ZANELLA

DOURADOS, MS
2012

**EXTRATOS VEGETAIS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁGAR-ÁGUA E SOLO**

CLÁUDIA DE SOUZA ZANELLA
Engenheira Agrônoma

Orientador: PROF. DR. WALBER LUIZ GAVASSONI

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2012

EXTRATOS VEGETAIS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁGAR-ÁGUA E SOLO

por

Cláudia de Souza Zanella

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em: 17/12/2012

Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni
Orientador – UFGD/FCA

Prof^ª. Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi
Co-orientadora – UFGD/FCA

Prof^ª. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio
UFGD/FCA

Prof^ª. Dra. Adriana Viana Schwan Stoffel
UNIGRAN/ Faculdade de Ciências
Exatas e da Terra

Prof. Dr. Milton Parron Padovan
EMBRAPA/CPAO

Aos meus pais, Aquiltes e Léa, por serem meus exemplos de vida

Ao meu marido, Fábio, por seu amor e compreensão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e sempre abençoar a minha vida e de meus familiares.

Ao professor Walber Luiz Gavassoni, pela orientação, paciência e incentivo.

A professora Lilian Maria Arruda Bacchi, pelos ensinamentos e dicas.

A professora Anelise Samara Nazari Formagio por ceder os extratos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

A colega e amiga Daísa Bigaton por ceder sementes de feijão utilizadas neste trabalho.

Ao técnico de laboratório e colega Bruno Pontim, pela ajuda e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia e aos alunos de graduação pela convivência e ajuda na condução dos trabalhos.

A Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, pela liberação para capacitação.

A FUNDECT pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPITULO I - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1.1 INTRODUÇÃO.....	6
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
1.2.1. Obtenção, Multiplicação e Manutenção do Inóculo.....	8
1.2.2 Delineamento experimental e análise de dados.....	8
1.2.3 Espécies vegetais.....	8
1.2.4. Preparação, fracionamento e extração do óleo essencial das espécies vegetais.....	9
1.2.5 Germinação carpogênica sob diferentes extratos vegetais.....	9
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
1.3.1 Germinação carpogênica sob diferentes extratos vegetais.....	12
1.3.2 Crescimento micelial sob diferentes extratos vegetais.....	20
1.4 CONCLUSÕES.....	22
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPITULO II - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS APLICADO EM SOLO SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Obtenção, multiplicação e manutenção do inóculo.....	31
2.2.2 Delineamento experimental e análise de dados.....	31
2.2.3 Espécies vegetais.....	31
2.2.4. Preparação e fracionamento das espécies vegetais.....	32
2.2.5 Identificação da proporção solo:areia mais adequada para a germinação carpogênica.....	32
2.2.6 Avaliação da germinação carpogênica de escleródios de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i>	33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.3.1 Identificação da proporção solo:areia mais adequada para a germinação carpogênica.....	36
2.3.2 Avaliação da germinação carpogênica de escleródios de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i>	38
2.4 CONCLUSÕES.....	48

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO III - EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE FEIJOEIRO COMUM.....	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.2.1 Espécies vegetais.....	57
3.2.2 Preparação, fracionamento e extração do óleo essencial das espécies vegetais.....	57
3.2.3 Delineamento experimental e análise de dados.....	57
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.4 CONCLUSÕES.....	62
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

EXTRATOS VEGETAIS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁGAR-ÁGUA E SOLO

RESUMO: Objetivou-se avaliar a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* na presença de diferentes extratos e frações resultantes do particionamento de extratos vegetais em ágar-água; avaliar o crescimento micelial do patógeno sob diferentes concentrações do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*; identificar a proporção de solo e areia mais adequada para a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*; avaliar a ação de extratos e frações resultantes do particionamento de extratos vegetais aplicados em solo:areia (1:1) sobre a germinação carpogênica do patógeno e verificar o efeito de extratos metanólicos de *S. terebinthifolius*, *Palicourea crocea* e *Annona cacans* sobre plantas de feijoeiro. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação ou no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados. Para os experimentos de avaliação da germinação carpogênica e identificação da melhor proporção solo:areia foram utilizadas caixas tipo gerbox contendo 20 escleródios. Foram realizadas avaliações semanais, a partir das quais calculou-se a porcentagem de germinação carpogênica. Para a avaliação do crescimento micelial o óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi incorporado ao meio batata-dextrose-ágar e vertido em placas de Petri que receberam um disco micelial do patógeno. As avaliações foram realizadas diariamente mensurando-se o diâmetro das colônias. Para avaliar a ação dos extratos sobre as plantas de feijoeiro, utilizou-se bandejas de polietileno onde foram aplicados via pulverização os extratos vegetais sobre as plantas, aos 30 dias após a semeadura. Em meio ágar-água, os extratos de *P. crocea*, a frações acetato de etila de *Geophilla repens* e as frações acetato de etila e clorofórmica de *A. cacans* e reduziram a germinação carpogênica. Escleródios de *S. sclerotiorum* apresentaram maior germinação carpogênica quando inseridos no substrato solo e areia na proporção 1:1. Houve menor germinação carpogênica sob a fração acetato de etila de ervilhaca e fração acetato de etila de *S. terebinthifolius*, quando estes foram aplicados em solo:areia (1:1) aos 30 dias após a instalação do ensaio. Os extratos não apresentaram fitotoxicidade ao feijoeiro.

Palavras-chave: Mofa-branco, controle alternativo, escleródios

PLANT EXTRACTS AND CARPOGENIC GERMINATION OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN ÁGAR-ÁGUA AND SOIL

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the carpogenic germination of *S. sclerotiorum* under different plants extracts in water-agar, the mycelial growth of the pathogen under different concentrations of essential oil of *Schinus terebinthifolius*; identify the proportion of sand and soil most suitable for carpogenic germination of *S. sclerotiorum*; evaluate the effect of plants extracts sprayed in soil:sand (1:1) on the carpogenic germination of the pathogen and verify the effect of methanol extracts of *S. terebinthifolius*, *Palicourea crocea* and *Annona cacans* on common bean. The experiments were conducted in a greenhouse or in the Laboratory of Agricultural Microbiology and Plant Pathology of the Faculdade de Ciências Agrárias of Universidade Federal da Grande Dourados. For experiments evaluating the germination carpogenic and identify the best ratio soil:sand gerboxes were used containing 20 sclerotia. Weekly was calculated the percentage of carpogenic germination. For the evaluation of the essential oil mycelial growth of *S. terebinthifolius* was incorporated into potato-dextrose-agar and poured into Petri dishes that received a mycelial disc of the pathogen. The evaluations were performed daily by measuring the diameter of the colonies. To evaluate the effects of the extracts on bean plants, polyethylene trays were used and 30 days after sowing, the plant extracts were sprayed on the plants. In agar-water extracts of *P. crocea*, *Geophilla repens* and *A. cacans* fraction ethyl acetate and fraction chloroform reduced the germination carpogenic. Sclerotia of *S. sclerotiorum* showed higher germination carpogenic when placed on soil and sand 1:1. There was a lower carpogenic germination when extracts of vetch fraction ethyl acetate and *S. terebinthifolius* fraction ethyl acetate, was spread in the substrate soil: sand (1:1) at 30 days after installation of the test. The extracts showed no phytotoxicity to common bean.

Index terms: White mold, alternative control, sclerotia

INTRODUÇÃO GERAL

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como mofo branco ou podridão de esclerotínia, ataca culturas economicamente importantes como algodão, feijão, girassol, soja e tomate. Segundo Boland e Hall (1994) 408 espécies de plantas são hospedeiras deste patógeno, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas.

O fungo tem a capacidade de formar estruturas de resistência, os escleródios, que garantem sua sobrevivência por vários anos. Os escleródios são agregados compactos de hifas somáticas com camada externa melanizada, sobrevivem a condições adversas e são resistentes à degradação microbiana e química (BELL e WHEELER, 1986 citados por BOLTON et al., 2006; BUTLER et al., 2009). A parte interna do escleródio, a medula, é embebida em uma matriz fibrilar composta por carboidratos, principalmente β -glucanos, e proteínas (LE TOURNEAU, 1979).

Townsend e Willetts (1954), citados por Bolton et al. (2006) caracterizaram três fases distintas no processo de formação do escleródio: na fase inicial ocorre o crescimento aleatório e agregação de hifas resultando em uma massa compacta e branca, na fase de desenvolvimento ocorre o crescimento das hifas, aumento da área de agregação e compactação do agregado e na última fase (maturação) ocorre a delimitação de superfície do agregado, deposição de melanina nas células da camada superficial, formando uma camada protetora e a consolidação interna da massa micelial. O escleródio maduro é recoberto por uma superfície pigmentada e no interior encontra-se uma medula de tecido parcialmente embebida em uma matriz gelatinosa, que fornece os nutrientes para a germinação.

Os escleródios sobrevivem no solo por até oito anos e sob condições adequadas de temperatura e umidade, germinam miceliogenicamente, formando micélio ou carpogenicamente, formando apotécios (ADAMS e AYERS, 1979). A germinação miceliogenicamente produz hifas hialinas, multinucleadas, septadas, ramificadas, que podem atacar diretamente as plantas (BOLTON et al., 2006), apesar de vários estudos demonstrarem que o micélio ataca diretamente a base das plantas na região próxima à superfície do solo (HOLLEY e NELSON, 1986; HUANG e DUECK 1980, citados por DILLARD et al., 1995).

Na germinação carpogênica, primeiramente o primórdio, de coloração hialina a marrom, aparece no córtex ou medula do escleródio, a partir de uma junção de hifas entrelaçadas. As hifas dividem-se, formam uma saliência de hifas enoveladas com citoplasma denso e rompem a camada superficial de melanina do escleródio. Uma vez que essa camada é rompida, o primórdio, ou estipe, continua a crescer e se desenvolver, até formar uma depressão na sua extremidade (KOSASHIH e WILLETTS, 1975 citados por LE TORNEAU, 1979), chamada himênio, local onde irão se desenvolver as ascas e dentro de cada asca ocorre a produção de oito ascósporos binucleados, elipsóides e hialinos (BOLTON, 2006). Os ascósporos são liberados dos ascos no ambiente e são considerados a principal fonte de inóculo da doença (MILA e YANG, 2008; HAO et al., 2003). Os ascósporos são cobertos por uma mucilagem pegajosa que facilita a sua adesão ao substrato em que se depositarem (BOLTON et al., 2006), como tecidos de plantas hospedeiras (ABAWI e GROGAN, 1979). Os ascósporos somente irão infectar o tecido vegetal se encontrarem uma fonte de energia exógena e condições adequadas de umidade (ABAWI e GROGAN, 1979). A germinação carpogênica irá ocorrer se o escleródio encontrar condições adequadas de temperatura e umidade, com a temperatura variando de 13 a 20°C e umidade constante acima de 75% da capacidade de campo (FERRAZ et al., 1999; GERALDINE et al., 2010; NAPOLEÃO et al., 2007; MILA e YANG, 2008; SUN e YANG, 2000).

O controle do mofo branco é difícil devido à presença de escleródios no solo, aos ascósporos que podem ser levados a longas distâncias pelo vento e à alta suscetibilidade dos hospedeiros cultivados (GARCIA, 2008). O controle do patógeno em diversas culturas se dá principalmente por meio de práticas como o uso de fungicidas, devido à falta de resistência genética nas plantas hospedeiras (BARDIN e HUANG 2001; DIAS et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2010) e a ineficiência da rotação de culturas (BARDIN e HUANG, 2001; GÖRGEN, 2009). Entretanto novos métodos de controle estão sendo estudados, pois o uso contínuo de fungicidas pode promover a seleção de patógenos resistentes, colocando em risco a sua eficácia (GHINI e KIMATI, 2000) e tem aumentado a pressão por parte de consumidores que buscam produtos livres de agrotóxicos (PATRICIO, 2007). Desta forma a exploração da atividade fungicida de extratos de plantas pode se constituir em uma forma potencial de controle de doenças de plantas (DOMINGUES et al., 2009; LEE et al., 2001; STANGARLIN et al., 1999).

Garcia et al. (2012) verificaram que o óleo de nim indiano (*Azadirachta indica*) inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, mas esse efeito foi maior quando foi associado ao óleo de karanja (*Pongamia glabra*) demonstrando o efeito sinérgico entre os óleos. Extratos de folhas de Santa Bárbara (*Melia azedarach* L.), mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), arruda (*Ruta graveolens* L.) e pimenta longa (*Piper aduncum* L.) inibiram em média 25% do crescimento micelial, já o extrato de frutos de pimenta longa proporcionaram inibição de 43% do crescimento micelial do fungo. Mello et al. (2005) também verificaram que o óleo de nim inibiu o crescimento micelial do patógeno.

Óleos essenciais de *Lippia alba*, *Tagetes minuta*, *P. aduncum* e *Psidium cattleianum*, inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* a partir das concentrações de 0,01%, 0,20%, 0,10 e 0,05%, respectivamente (PANSERA et al., 2011), já os óleos de orégano (*Origanum syriacum* var *bevanii*) e funcho (*Foeniculum vulgare*) apresentaram inibição total do crescimento micelial do patógeno, a partir das concentrações de 3,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (SOYLU et al., 2007). Plantas nativas do cerrado já tiveram seu efeito comprovado *in vitro* contra *S. sclerotiorum*, a exemplo de *Annona* sp. (SILVA et al., 2008) e *Xylopia* sp. (ASSIS et al., 2008). Extratos e frações de plantas cultivadas, como milho, trigo, aveia, ervilhaca e feijão também apresentam efeito negativo na germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* (SILVA et al., 2011).

O efeito de extratos e óleos vegetais é muito estudado em relação ao crescimento micelial do patógeno, entretanto são escassos os trabalhos relativos à germinação carpogênica dos escleródios. Algumas pesquisas embora tenham constatado a ação de extratos sobre a emissão de apotécios, não testaram o efeito destes extratos quando aplicados ao solo, tampouco foram avaliados os efeitos dos extratos sobre os vegetais. Dessa forma, objetivou-se no presente trabalho, avaliar o efeito de diferentes extratos vegetais sobre a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* em meio ágar-água e em solo e sobre feijoeiro comum.

CAPITULO I

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO: A germinação carpogênica e o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* foram avaliados sob extratos metanólicos de *Annona cacans*, *A. coriacea*, *A. sylvatica*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *Schinus terebinthifolius*, *Trichilia sylvatica*, *Geophila repens*, *Palicourea crocea* e *Guettarda viburnoides*, frações hexânica, hidrometanólica, clorofórmica e acetato de etila de *A. cacans* e óleo essencial de *S. terebinthifolius* em ensaios conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições. A concentração dos extratos foi de 1000 ppm e das frações foi 100 ppm. Os extratos vegetais e as frações foram incorporados em meio ágar-água que foi vertido em caixas gerbox com 20 escleródios. O crescimento micelial foi avaliado em óleo essencial de *S. terebinthifolius*, sob três concentrações, incorporado ao meio BDA. A germinação carpogênica apresentou-se menor sob os extratos de *P. crocea*, *G. repens* e *S. terebinthifolius* e sob as frações acetato de etila e clorofórmica de *A. cacans*. O número de apotécios formados por gerbox foi menor com o extrato de *A. cacans*. O crescimento micelial apresentou 10% de inibição na maior concentração do óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

Palavras-chave: mofo branco, apotécio, controle alternativo

**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS ON *Sclerotinia*
*sclerotiorum***

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the effect of methanolic extracts of *Annona cacans*, *A. coriacea*, *A. sylvatica*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *Schinus terebinthifolius*, *Trichilia silvatica*, *Geophila repens*, *Palicourea crocea* and *Guettarda viburnoides*, of *A. cacans* hexane, ethyl etila, aqueous and chloroform fractions and the essential oil of *S. terebinthifolius* on mycelial growth and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. The experiments were conducted in the Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia at the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) and the concentrations was 1000 ppm for the extracts en 100 ppm for the fractions. The experimental design was completely randomized with 10 replicates. To evaluate germination carpogenic, extracts and fractions were incorporated in agar-water that was poured into gerboxes where 20 sclerotia were distributed. To evaluate the mycelial growth, essential oil of *S. terebinthifolius* in 3 concentrations was incorporated into the PDA and then poured into Petri dishes, to where pathogen mycelial discs were transferred. Extracts of *P. crocea*, *G. repens* and *S. terebinthifolius* and *Annona cacans* ethyl acetate and chloroform fractions reduced the carpogenic germination of sclerotia of *S. sclerotiorum* and the extract of *A. cacans* reduced the number of apothecia formed. The mycelial growth showed 10% inhibition at the highest concentration of essential oil of *S. terebinthifolius*.

Key-words: white mold, apothecium, altenative control

1.1 INTRODUÇÃO

O controle de doenças de plantas é realizado principalmente pelo uso de fungicidas, em função da facilidade de aplicação e dos resultados imediatos (GHINI e KIMATI, 2000). Entretanto a procura por vegetais e seus produtos livres de agrotóxicos é crescente, estimulando a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. Dentro deste contexto, a atividade de compostos secundários presentes em extratos ou óleos essenciais de plantas medicinais pode constituir-se em mais uma forma de controle alternativo de doenças em plantas (STANGARLIN et al., 1999). De acordo com Patrício (2007) a utilização de biopesticidas é um dos métodos mais promissores e pesquisados para o controle de doenças da parte aérea das plantas. Biopesticidas são produtos formulados com fungos, bactérias ou substâncias naturais, como extrato de plantas (WHEELER, 2002)

As plantas têm a capacidade de produzir metabólitos secundários como fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides e alcalóides e em muitos casos, estas substâncias atuam como defesa da planta contra microrganismos, insetos e herbívoros. Cientistas de diversos campos têm investigado as atividades antimicrobianas das plantas demonstrando a ação inibitória a vários grupos de microrganismos devido à produção de fitoquímicos (CAWAN, 1999).

Extratos ou óleos essenciais de diversas espécies foram avaliados e tiveram seu efeito comprovado no controle de fungos fitopatogênicos, como é o caso de cravo-da-índia, alho, canela (VENTUROSO et al., 2011), melão-de-são-caetano (SILVA et al., 2011), pimenta-longa (LEE et al., 2001), orégano e funcho (SOYLU et al., 2007), gengibre (RODRIGUES et al., 2007), nim (CARNEIRO et al., 2007), manjerição, arruda e carqueja (STANGARLIN et al., 1999) e *Schinus terebinthifolius* (LIMA et al., 2010; RHOUMA et al., 2009), evidenciando o potencial do uso de extratos e óleos vegetais como alternativa aos fungicidas químicos.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como mofo branco ou podridão de esclerotínia, pode infectar mais de 400 espécies de plantas entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (BOLLAND e HALL, 1994). Este fungo é considerado um dos patógenos mais importantes no mundo e

está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam elas temperadas, subtropicais ou tropicais, podendo atacar culturas como alfafa, batata, canola, ervilha, feijão, fumo, girassol, soja e tomate (LEITE, 2005). Vários estudos já demonstraram o efeito de extratos de plantas no controle deste patógeno.

Silva et al. (2008), ao testar os extratos de folhas e do cerne e córtex da raiz e do caule da “fruta-do-conde”, planta pertencente à família *Annonaceae* verificaram que o extrato hexânico do cerne do caule da planta foi ativo contra o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, entretanto, os demais extratos testados não apresentaram o mesmo efeito. Os autores sugerem que o princípio ativo contra o patógeno deve estar presente em maior concentração no cerne do caule do que nas demais partes da planta.

O gengibre (*Zingiber officinalis*) possui compostos com atividades antimicrobianas como gingerol e zingibereno (ALBUQUERQUE, 1989). Rodrigues et al. (2007) verificaram que o extrato aquoso de gengibre inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 92,5% e em quase 30% a produção de escleródios na concentração de 25%, entretanto a incidência da doença foi menor em plantas de alface quando foi utilizada a massa do gengibre, quando comparada com o extrato aquoso. Plantas de alface tratadas com massa de gengibre apresentaram maior atividade da peroxidase, o que, segundo os autores, poderia justificar a menor incidência da doença nesse tratamento, pois a enzima está relacionada com a lignificação dos tecidos, o que dificultaria a entrada do patógeno na planta e reduziria a difusão de nutrientes para o fungo e de toxinas e enzimas fúngicas para a planta.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob diferentes extratos e óleos de espécies vegetais e avaliar o crescimento micelial do patógeno sob diferentes concentrações do óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com cinco ensaios para avaliar a germinação carpogênica e o segundo com um ensaio para avaliar o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de maio de 2010 a janeiro de 2012.

1.2.1. Obtenção, Multiplicação e Manutenção do Inóculo

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram obtidos em área naturalmente infestada pelo patógeno no município de Chapadão do Sul, MS. Os escleródios foram produzidos a partir da repicagem do micélio do fungo para erlenmeyers contendo discos de cenoura previamente autoclavados. Os frascos foram incubados a 25°C, em escuro pleno, por aproximadamente 30 dias. Após esse período, os escleródios formados foram retirados dos frascos, lavados em água corrente e armazenados a 5°C até a sua utilização nos experimentos.

1.2.2 Delineamento experimental e análise de dados

Nos experimentos, os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco seno da $\sqrt{(x+1)/100}$ e os demais dados em $\sqrt{x+1}$. Foi realizada a análise de variância com o auxílio do programa SISVAR, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de germinação carpogênica foram submetidos à análise de regressão entre o tempo de incubação (dias) como fator independente e a germinação carpogênica (%) como variável dependente para os extratos testados.

1.2.3 Espécies vegetais

Folhas das espécies vegetais *Annona cacans*, *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. sylvatica* e *Trichilia sylvatica* foram coletadas próximo a cidade de Dourados, MS. As espécies *Geophila repens*, *Palicourea crocea* e *Guettarda viburnoides* foram coletadas no Parque Ivinhema, no município de Ivinhema, MS. Frutos, folhas e caules de *Schinus terebinthifolius* foram coletados no Horto de Plantas Medicinais da

UFGD, no município de Dourados, MS. As espécies foram identificadas pela professora Dr. Zefa Valdevina Pereira e as exsiccatas sob registro *A. cacans* (DDMS 3818), *A. coriacea* (DDMS 186), *A. crassiflora* (DDMS 4599), *A. dioica* (DDMS 4598), *A. sylvatica* (DDMS 4600), *G. repens* (DDMS 4467), *G. viburnoides* (DDMS 3520), *P. crocea* (DDMS 4448), *S. terebinthifolius* (DDMS 4602) e *T. silvatica* (DDMS 4662) encontram-se depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA/UFGD.

1.2.4. Preparação, fracionamento e extração do óleo essencial das espécies vegetais

O material vegetal (folhas) das espécies foi desidratado em estufa de ar circulante à temperatura de 55°C e triturado em moinho de facas. O extrato metanólico foi obtido por maceração exaustiva com metanol.

Os extratos foram submetidos à particionamento líquido-líquido, com hexano, clorofórmico e acetato de etila, que com posterior evaporação dos solventes em rota evaporador resultaram nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica.

Para obtenção do óleo essencial, frutos de *S. terebinthifolius* foram submetidos à hidrodestilação em aparelho Clevenger, por quatro horas. O óleo essencial obtido foi lavado com hexano e seco com sulfato de sódio anidro.

1.2.5 Germinação carpogênica sob diferentes extratos vegetais

Para a avaliação da germinação carpogênica foram realizados cinco ensaios, em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições e o número de tratamentos variando para cada ensaio, conforme descrito no quadro 1.

Os extratos e partições foram dissolvidos em tubos de ensaio contendo água esterilizada e autoclavada, na proporção de 0,5g de extrato e 9,5 mL de água. Após agitação dos tubos em agitador Vortex para a dissolução dos extratos, a solução foi vertida em 490 mL do meio ágar-água e transferida para caixas tipo gerbox (11,5 x 11,5 x 3,5 cm). Vinte escleródios foram então distribuídos sobre o meio e os gerbox foram incubados a 18°C com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. A concentração final dos extratos e do óleo foi de 1000 ppm e das fases de 100 ppm.

As avaliações iniciaram-se a partir da verificação da emissão de estipes, foi enumerado o número total de escleródios com emissão de estipes e de apotécios e o

número total de estipes e de apotécios por unidade experimental. Com base no número de escleródios com apotécios, foi calculada a porcentagem de germinação carpogênica. Foi considerada germinação carpogênica a formação de apotécios pelo escleródio.

QUADRO 1. Ensaios realizados da germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) e frações obtidas a partir da partição dos extratos vegetais (100 ppm)

Ensaio	Tratamentos
1	<i>A. cacans</i> <i>A. coriacea</i> <i>A. sylvatica</i> <i>A. crassiflora</i> <i>A. dioica</i> Testemunha (somente ágar/água)
2	<i>A. cacans</i> <i>A. cacans</i> – fração hexânica <i>A. cacans</i> – fração clorofórmica <i>A. cacans</i> – fração acetato de etila <i>A. cacans</i> – fração hidrometanólica <i>S. terebinthifolius</i> Fungicida (i.a. Procimidone - 150 g 100 L ⁻¹)* Testemunha (somente ágar/água)
3	<i>T. silvatica</i> <i>G. repens</i> <i>P. crocea</i> <i>G. viburnoides</i> Testemunha (somente ágar/água)*
4	<i>P. crocea</i> <i>G. repens</i> <i>G. viburnoides</i> Fungicida (i.a. Procimidone - 150 g 100 L ⁻¹)* Testemunha (somente ágar/água)
5	<i>S. terebinthifolius</i> (caule) <i>S. terebinthifolius</i> (folha) <i>S. terebinthifolius</i> (óleo essencial) Fungicida (i.a. Procimidone - 150 g 100 L ⁻¹)* Testemunha (somente ágar/água)

* concentração de 75 g i.a. L⁻¹

1.2.6 Crescimento micelial sob diferentes extratos vegetais

Para a avaliação do crescimento micelial foi realizado um ensaio, em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Os tratamentos constaram das concentrações de 0, 100 e 1000 ppm de óleo essencial de *S. terebinthifolius*, e o fungicida procimidone (150 g 100 L⁻¹).

O óleo essencial de *S. terebinthifolius* e o fungicida foram homogêneos ao meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram transferidos para o centro das placas discos miceliais do patógeno com 0,3 cm de diâmetro provenientes de cultura pura em meio BDA. As placas foram incubadas a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. As avaliações, realizadas diariamente, iniciaram-se 24 horas após a incubação e foram encerradas 96 horas após, mensurando-se o diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais, com o auxílio de uma régua milimetrada. A inibição do crescimento do patógeno (%) foi obtida comparando-se o diâmetro médio, em cm, entre as colônias sob tratamentos e a testemunha, após 4 dias de incubação, por meio da fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Germinação carpogênica sob diferentes extratos vegetais

Observou-se que alguns dos extratos metanólicos avaliados afetaram a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. No primeiro ensaio (Figura 1), utilizando os extratos metanólicos de *A. cacans*, *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. sylvatica* e *A. dioica*, apenas na avaliação realizada aos 43 dias após incubação (DAI) foi observada diferença na germinação carpogênica entre os tratamentos (Quadro 2), na qual a testemunha apresentou menor porcentagem de germinação carpogênica em relação à *A. cacans*, *A. dioica* e *A. coriacea*, 72, 71 e 75%, respectivamente. Entretanto, nas avaliações posteriores a germinação carpogênica da testemunha aumentou, igualando-se aos demais tratamentos. O extrato de *A. cacans*, aos 50 DAI inibiu a emissão do número de apotécios, em relação à testemunha e aos extratos de *A. dioica* e *A. coriacea*.

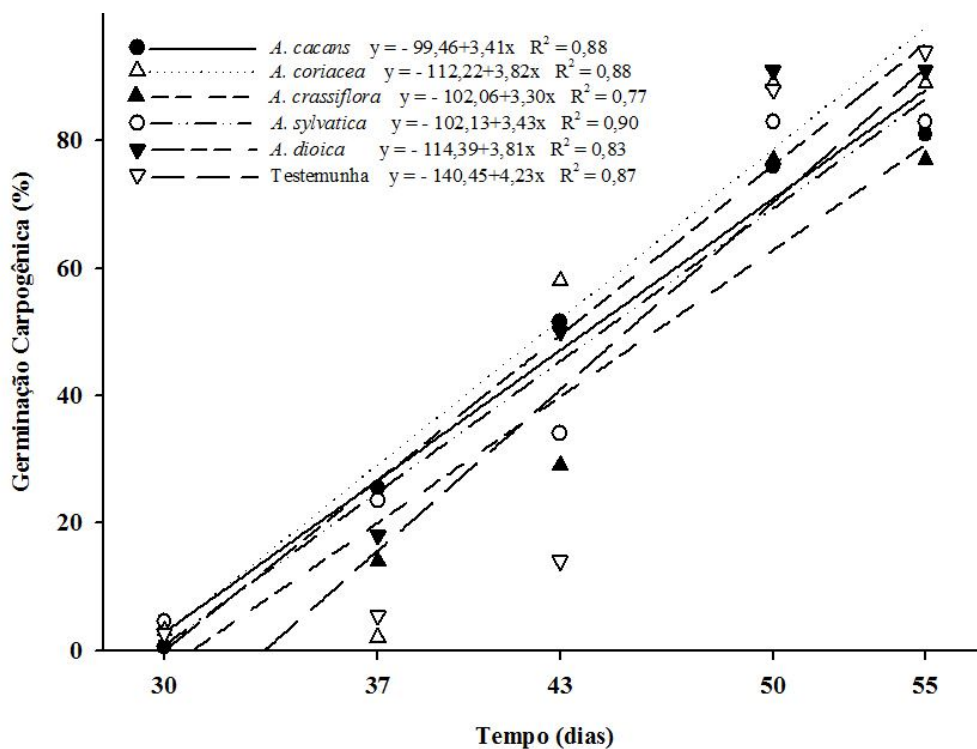


FIGURA 1. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* em extratos metanólicos (1000 ppm) de diferentes espécies de Annonaceae em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 2. Germinação carpogênica (GC) e número de apotécios formados (NAF) por unidade experimental de escleródios de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) de diferentes espécies de Annonaceae aos 43 e 50 dias de incubação (DAI), respectivamente

Tratamento	GC (%) aos 43 DAI	NAF aos 50 DAI
<i>A. cacans</i>	51,5 a	40,3 b
<i>A. sylvatica</i>	34,0 ab	67,0 ab
<i>A. crassiflora</i>	29,5 ab	53,7 ab
<i>A. dioica</i>	50,0 a	80,1 a
<i>A. coriacea</i>	58,5 a	79,6 a
Testemunha	14,5 b	79,9 a
CV (%)	46,9	22,6

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora não tenham apresentado efeito sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*, extratos hexânicos de *A. coriacea* e *A. crassiflora* apresentaram inibição da germinação de uredosporos de *Phakopsora pachyrhizi* na ordem de 93,9 e 96,25%, respectivamente (LIMA et al., 2007). O fungo *Alternaria solani* teve seu crescimento micelial inibido em 26% e 17,5% quando exposto aos extratos hexânicos de *A. crassiflora* e *A. coriacea*, respectivamente (MARQUES et al., 2007). Entretanto, extratos etanólicos de *A. crassiflora* não apresentaram efeito no crescimento micelial de *Fusarium solani*, mesmo na maior concentração que foi de 1600µg.mL⁻¹ (RÊGO et al., 2011).

Apesar da presença de polifenóis nos extratos metanólicos de *A. sylvatica*, *A. coriacea* e *A. crassiflora*, que provavelmente foram os responsáveis por afetarem negativamente a germinação de sementes de alface (BALDIVIA et al., 2010), estes extratos não apresentaram nenhuma ação na germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, sugerindo que os compostos presentes nestes extratos, na concentração utilizada, não afetam o patógeno em questão. São escassos os trabalhos avaliando a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*, mas ao avaliarem o crescimento miceliogênico do patógeno em meio BDA, Silva et al. (2008) verificaram que apenas o extrato de cerne do caule de *Annona* sp. inibiu o

crescimento micelial do patógeno, enquanto que os extratos de folha e raiz não apresentaram efeito sobre o fungo.

No segundo ensaio (Figura 2), a inibição da germinação carpogênica, apresentou-se maior com o extrato metanólico de *S. terebinthifolius* e de *A. cacans* e suas frações acetato de etila e clorofórmica. Na avaliação realizada aos 78 DAI, a germinação carpogênica foi reduzida em 100, 94, 90 e 51% sob os extratos de *A. cacans*, *A. cacans* fração clorofórmica, *S. terebinthifolius* e *A. cacans* fração acetato de etila, respectivamente (Quadro 3).

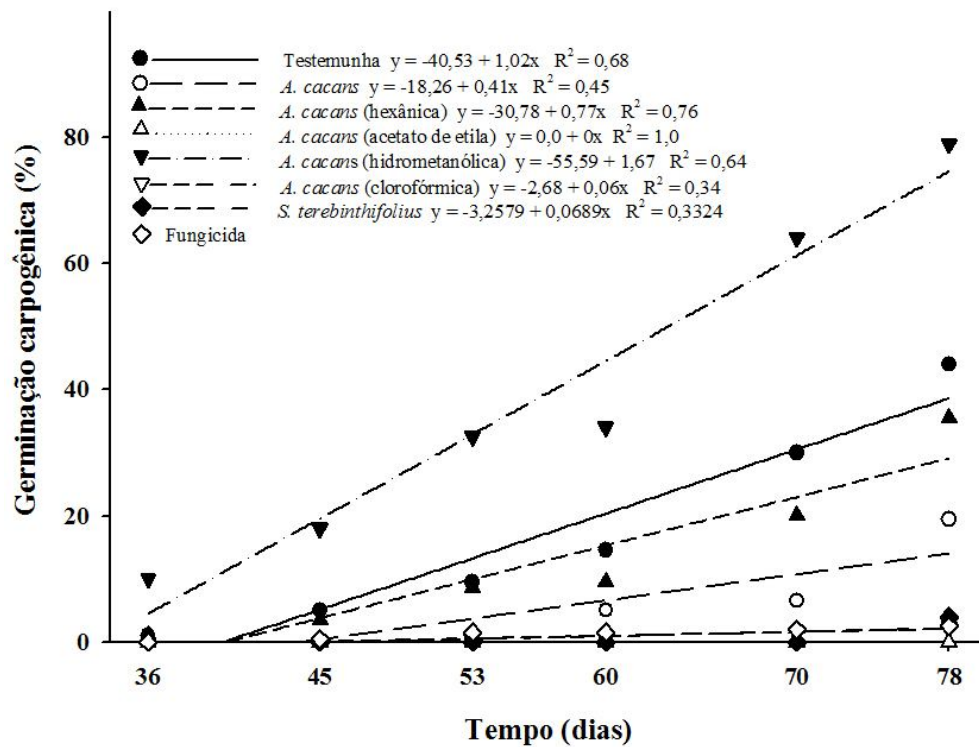


FIGURA 2. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* em extratos metanólicos (1000 ppm) de *S. terebinthifolius* e *A. cacans* e suas frações (100 ppm) hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica, em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 3. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) de *Schinus terebinthifolius* e *Annona cacans* e suas fases (100 ppm) hexânica, acetato de etila, hidrometanólica e clorofórmica aos 36, 45, 53, 60, 70 e 78 dias após incubação (DAI)

Tratamento	Germinação Carpogênica (%)					
	36 DAI	45 DAI	53 DAI	60 DAI	70 DAI	78 DAI
<i>Annona cacans</i>	0,0 b	0,0 b	1,0 b	5,0 bc	6,5 c	19,5 c
<i>A.cacans</i> – hexânica	1,0 ab	3,5 ab	8,5ab	9,5 abc	20,0 b	35,5 b
<i>A. cacans</i> – clorofórmica	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,5 c	1,5 c	2,5 d
<i>A. cacans</i> – acetato de etila	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c	0,0 d
<i>A. cacans</i> – hidrometanólica	10,0 a	18,0 a	32,5a	34,0 a	64,0 a	83,5 a
<i>S. terebinthifolius</i>	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c	4,0 cd
Procimidone*	0,0 b	0,5 b	1,5 b	1,5 bc	2,0 c	2,5 d
Testemunha	1,0 ab	5,0 ab	9,5ab	14,5 ab	30,0 b	44,0 b
CV (%)	44,1	93,0	79,6	70,1	40,5	38,7

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

O terceiro ensaio (Figura 3) foi realizado com os extratos metanólicos de *P. crocea*, *G. repens*, *T. silvatica* e *G. viburnoides*. Os dois primeiros extratos inibiram em 100% a germinação carpogênica dos escleródios em todas as épocas de avaliação, diferido-se da testemunha. A germinação carpogênica sob os extratos de *T. silvatica* e *G. viburnoides* foi menor que na testemunha somente na primeira avaliação, sendo que, nas demais avaliações, não houve diferença entre estes tratamentos e a testemunha (Quadro 4).

No quarto ensaio (Figura 4), foram utilizados os extratos de *P. crocea*, *G. repens*, *G. viburnoides*, além do fungicida procimidone, sendo que o resultado do segundo ensaio se repetiu, com *G. repens* e *P. crocea* inibindo a germinação carpogênica em relação ao extrato de *G. viburnoides* e à testemunha (Quadro 5).

Suffredini et al. (2006) consideram o extrato da parte aérea de *Palicourea guianensis* uma fonte potencial de antibiótico a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* em razão da baixa concentração mínima inibitória a estes patógenos, demonstrando a atividade antimicrobiana do gênero. Entretanto, Jorge

(2005) observou que o extrato bruto da planta *P. crocea* não foi ativo diante da *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Candida albicans*, pois a concentração mínima inibitória do extrato bruto foi maior que 1000 mg mL⁻¹ para todos os microrganismos.

Extratos de *Trichilia elegans* e *T. clausenii* não apresentaram efeito no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo que este último estimulou o crescimento do patógeno (SIERRA-HAYER et al., 2009), corroborando com os resultados do presente estudo, em que o extrato de *Trichilia* sp. não diferiu da testemunha nos dois ensaios em que foi testado.

O extrato de *Guettarda speciosa* possui alcalóides, flavonóides, triterpenóides, carboidratos, taninos e fenóis que se mostraram efetivos na inibição de *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (THAMIZHVANAN et al., 2010), entretanto para a germinação carpogênica do patógeno estudado no presente trabalho, esses compostos não apresentaram atividade inibitória.

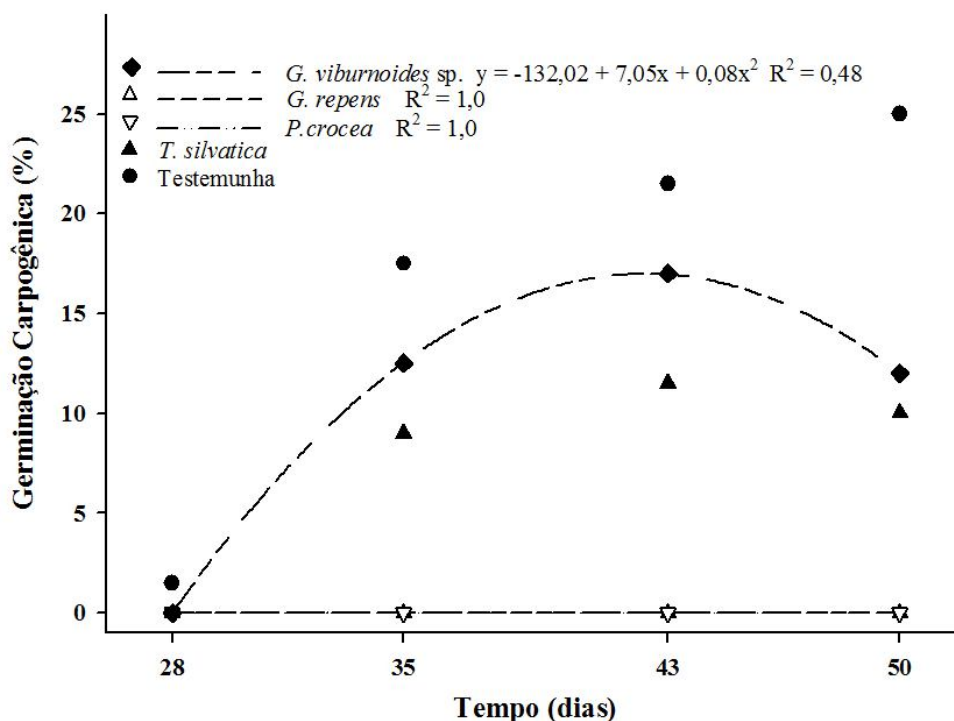


FIGURA 3. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* em extratos metanólicos (1000 ppm) de *T. silvatica*, *G. repens*, *P. crocea* e *G. viburnoides* em função do tempo (dias), após incubação.

QUADRO 4. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) de *T. silvatica*, *G. repens*, *P. crocea* e *G. viburnoides*, aos 28, 35, 43 e 50 dias após incubação (DAI)

Tratamento	Germinação Carpogênica (%)			
	28 DAI	35 DAI	43 DAI	50 DAI
<i>P. crocea</i>	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
<i>G. repens</i>	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
<i>T. silvatica</i>	0,0 b	11,0 ab	11,5 ab	13,5 a
<i>G. viburnoides</i>	0,0 b	14,4 a	14,4 a	12,0 ab
Testemunha	1,4 a	22,3 a	23,2 a	24,5 a
CV (%)	28,8	65,2	65,0	61,6

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

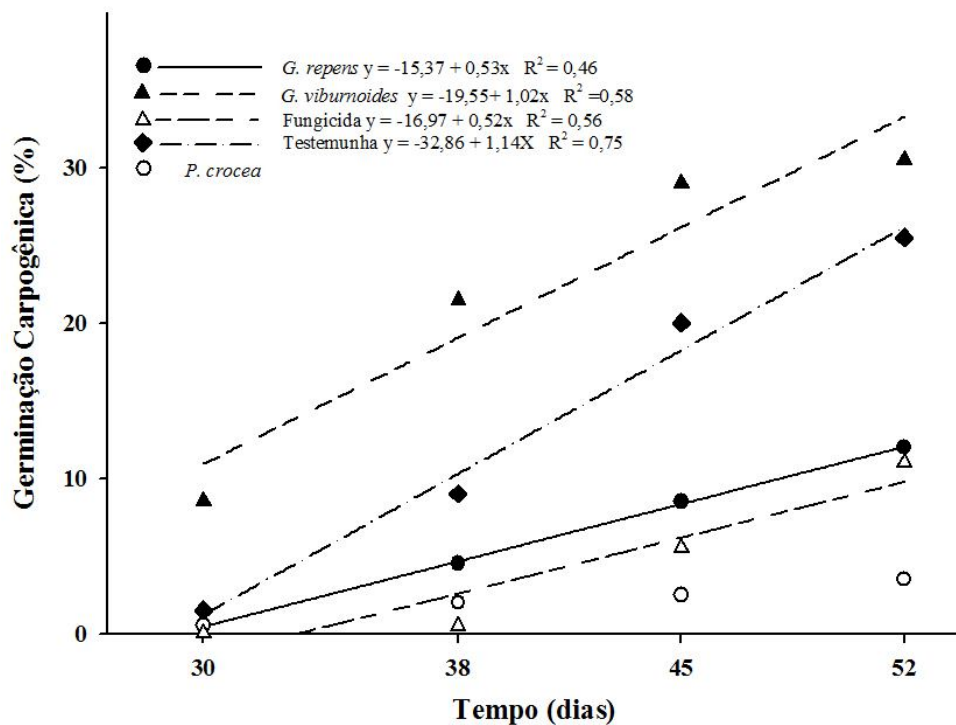


FIGURA 4. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* em extratos metanólicos (1000 ppm) de *G. repens*, *P. crocea*, *G. viburnoides* e fungicida procimidone (150 g 150 L⁻¹) em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 5. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) de *G. repens*, *P. crocea*, *G. viburnoides* e fungicida procimidone (150 g 100 L⁻¹) aos 30, 38, 45 e 52 dias após incubação (DAI)

Tratamento	Germinação Carpogênica (%)			
	30 DAI	38 DAI	45 DAI	52 DAI
<i>P. crocea</i>	0,5 b	2,5 b	2,5 c	3,5 c
<i>G. repens</i>	0,5 b	4,5 b	8,5 b	12,0 b
<i>G. viburnoides</i>	8,5 a	21,5 a	29,0 a	30,5 a
Procimidone*	0,0 b	0,5 c	5,5 bc	11,0 b
Testemunha	1,5 ab	9,5 ab	20,0 ab	25,5 a
CV (%)	62,8	52,4	40,8	32,1

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

No quinto ensaio foram utilizados óleo essencial e extratos de caule e folha de *S. terebinthifolius* (Figura 5). O extrato proveniente da folha teve comportamento semelhante ao fungicida, entretanto também não diferiu da testemunha (Quadro 6).

Para infectar o hospedeiro o fungo *S. sclerotiorum* necessita de uma fonte exógena de energia (ABAWI e GROGAN, 1979), que em muitas culturas são as flores (STEADMAN, 1983), por isso a época do florescimento é crucial para o estabelecimento da doença. Ao estudarem a podridão de esclerotínia em plantas de colza, Young e Werner (2012) verificaram que as pétalas das flores são a principal rota de infecção do patógeno. Desta forma, considerando que a janela de infecção pelo patógeno ocorre no florescimento, mesmo os extratos que inibiram apenas temporariamente a germinação carpogênica têm potencial para controle da doença, pois, quando ocorrer a liberação de esporos pelo apotécio, o período de maior predisposição da cultura a infecção terá sido ultrapassado. Esse efeito foi observado neste trabalho, pois na primeira avaliação a germinação carpogênica sob o óleo de *S. terebinthifolius* foi baixa, semelhante à germinação carpogênica sob o fungicida, somente na segunda avaliação, realizada aos 40 dias é que houve aumento de apotécios neste tratamento, em relação ao fungicida (Quadro 6).

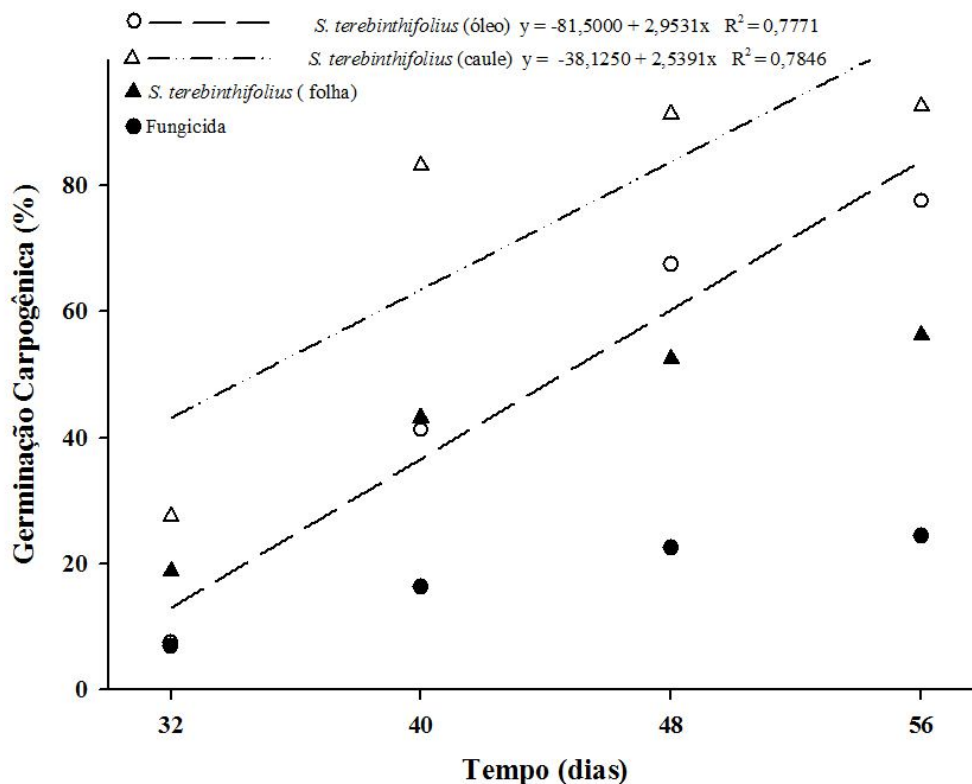


FIGURA 5. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* em extratos metanólicos e óleo essencial (1000 ppm) de *S. terebinthifolius* e fungicida procimidone (150 g 100 L⁻¹) em função do tempo (dias), após incubação.

QUADRO 6. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos, óleo essencial (1000 ppm) de *S. terebinthifolius* e fungicida procimidone (150 g 100 L⁻¹) aos 32, 40, 48 e 56 dias após incubação (DAI)

Tratamento	Germinação Carpogênica (%)			
	32 DAI	40 DAI	48 DAI	56 DAI
<i>Schinus terebinthifolius</i> (óleo)	7,5 b	41,0 a	67,5 a	77,5 a
<i>S. terebinthifolius</i> (folha)	18,8 ab	43,0 ab	52,5 ab	56,3 ab
<i>S. terebinthifolius</i> (caule)	27,5 a	83,0 a	91,3 a	92,5 a
Procimidone*	6,9 b	16,0 b	22,5 b	24,5 b
CV (%)	15,5	46,0	54,4	62,7

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

1.3.2 Crescimento micelial sob diferentes extratos vegetais

O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* também foi avaliado nas concentrações de 0, 100 e 1000 ppm do óleo essencial de *S. terebinthifolius* (Figura 6). Nas avaliações realizadas 24 e 48h após a incubação, as maiores concentrações proporcionaram inibição do crescimento da colônia, entretanto, na última avaliação não houve diferença entre as concentrações. A inibição do crescimento micelial foi de 10% na maior concentração (Quadro 7).

Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos, em que o patógeno *S. sclerotiorum* não foi afetado pela utilização de óleo ou extrato de *Schinus*. Pansera et al. (2011a), observaram que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* não controlou o crescimento micelial de *S. sclerotinia* em nenhuma das concentrações testadas. O óleo essencial de *Schinus molle* também não apresentou efeito sobre o patógeno (PANSERA et al., 2011b). Garcia et al. (2012) também verificaram que o extrato de *S. molle* inibiu somente 2,7% o crescimento micelial do fungo, não diferindo da testemunha.

Entretanto, o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* foi inibido em média 20% nas concentrações de 3 e 4% do extrato de *S. terebinthifolius* quando comparado à testemunha, mostrando resultados efetivos na redução do desenvolvimento do patógeno (LIMA et al., 2010). De acordo com Matos (1988), a mesma espécie botânica pode apresentar diferenças em sua composição química, em função de sua ocorrência em diferentes regiões. A análise cromatográfica do óleo essencial de *S. terebinthifolius* proveniente de frutos colhidos no horto de plantas medicinais da UFGD identificou predominância de monoterpenos em sua composição, destacando-se como principal constituinte o β -pineno (FORMAGIO et al., 2011), fitoconstituente com ação inibitória em bactérias como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes* (LEITE et al., 2007). Portanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados utilizando-se outras concentrações do óleo proveniente de frutos para verificar seu efeito sobre o patógeno.

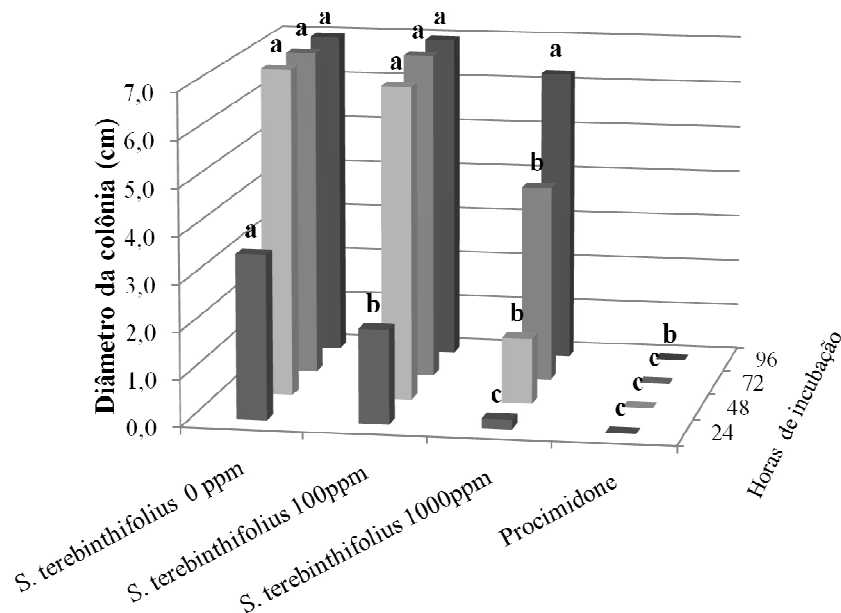


FIGURA 6. Diâmetro (cm) da colônia de *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA, sob diferentes concentrações de óleo essencial de *S. terbinthifolius* e fungicida Procimidone (150 g 100 L⁻¹), após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Médias seguidas da mesma letra em cada tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

QUADRO 7. Inibição do crescimento micelial (%) de *S. sclerotiorum* sob três concentrações de óleo essencial de *S. terbinthifolius* e fungicida Procimidone (150 g 100 L⁻¹), após 96h de incubação

Tratamentos	Inibição (%)
0ppm	0,0 c
100ppm	0,0 c
1000ppm	10,0 b
Procimidone*	100,0 a
CV (%)	32,1

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

1.4 CONCLUSÕES

A germinação carpogênica teve aumento linear com o passar do tempo em todos os extratos e partições testadas, exceto sob o extrato de *G. viburnoides*, em que foi verificada menor germinação carpogênica na última avaliação.

Em meio ágar-água, os extratos de *P. crocea*, *G. repens* e as frações clorofórmica e acetato de etila de *A. cacans* reduziram a germinação carpogênica, indicando que estes extratos podem ter compostos com atividade fungicida em relação à *S. sclerotiorum*.

Apesar de não ter reduzido a germinação carpogênica, o extrato de *A. cacans* reduziu o número de apotécios formados por unidade experimental.

Sob o óleo essencial de *S. terebinthifolius* na concentração de 1000 ppm, observou-se inibição de 10% do crescimento micelial do patógeno.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.899-904. 1979.

ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989. 96p.

BALDIVIA, D.S.; CARVALHO, F.C.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H.; FORMAGIO, A.S.N. Potencial alelopático de espécies vegetais pertencentes a Annonaceae da região de Dourados-MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindóia. **Anais... SBQ**, 2010.

CAWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n.4, p.564-582, 1999.

BOLLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E.C.; GOMES, J.C. Eficácia de extratos de nim para o controle de oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

FORMAGIO, A. S. N.; IRIGUCHI, E.K.K.; ROVEDA, L.M.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; ZARATE, N.A.H.; TABALDI, L.A.; KASSUYA, C.A.L. Chemical compositions and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 8, p. 1555-1559, 2011.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p.48-57, 2012.

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

JORGE, T.C.M. **Estudo químico e farmacológico de duas espécies da família rubiaceae: *Cephalanthus glabratus* e *Palicourea crocea***. 2005. 225f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

LEE, S.E.; PARK, B.S.; KIM, M.K.; CHOI, W.S.; KIM, H.T.; CHO, K.Y.; LEE, S.G.; LEE, H.S. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 20, n.6, p. 523-528, 2001.

LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; TRAJANO, V.N.; MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth

of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 3p. (Comunicado Técnico, 76).

LIMA, N.B.; MARQUES, M.W.; CAIXETA, L.; NAUE, C.R. Avaliação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010.

LIMA, V.S.; MAGNANI ZAMBENEDETTI, E.B.; MARQUES, C.A.G. Avaliação in vitro do efeito de *Annona crassiflora* Mart e *Annona coreacea* Mart sobre a germinação de uredosporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi* causador da ferrugem asiática na soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá, **Fitopatologia Brasileira**, v.32, 2007, p. S112.

MARQUES, C.A.G.; MAGNANI ZAMBENEDETTI, E.B.; LIMA, V.S.; ZAMBENEDETTI, G. B.; SOUPINSKI, J. Avaliação in vitro do extrato hexânico de *Annona crassiflora* Mart e *Annona coreacea* Mart sobre o fungo *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout, causador da pinta-preta em tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, 2007, p. S113.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1988. 128p.

PANSERA, M.R.; VICENÇO, C.B.; CONTE, R. I. ; SARTORI, V.C.; RIBEIRO, R.T.S. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary com a utilização de óleos essenciais de *Cinnamomum canphora* Nees & Eberm variedade linalolifera e *Schinus terebinthifolius* Raddi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 2011a, p. S588.

PANSERA, M.R.; VICENÇO, C.B.; CONTE, R. I. ; SARTORI, V.C.; RIBEIRO, R.T.S. Controle alternativo da podridão branca da haste em plantas de soja, com a utilização de óleos essenciais de plantas nativas do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 2011b, p. S587.

PATRICIO, F.R.A. Controle de doenças de hortaliças – convencional vs. alternativo. Palestra. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 20., 2007, São Paulo. **O Biológico**, v. 69, n.2, p.87-90, 2007.

RÊGO, C.M.; SANTOS, F.S.; BOMFIM, B.S.A.; RODRIGUES, C.S.; COSTA, J.A.S.; MACHADO, L.L. Atividade antifúngica de extratos de *Annona crassiflora* (Mart.), *Eugenia dysenterica* (DC.) e *Lafoensia pacari* (St. Hil.) sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, v.36, 2011, p. S832.

RHOUMA, A.; DAOUD, H.B.; GHANMI, S.; SALAH, H.B.; ROMDHANE, M.; DEMAK, M. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n.2, p. 339-345, 2009.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.

SIERRA-HAYER, J.F.; PASSADOR, M.M.; BALDIN, E.L.; BETELONI, F.G.; FURTADO, E.L. Efeito de extratos aquosos no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de seringueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42., 2009, Rio de Janeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 2009, p. S728.

SILVA, J.G.; MELO, R.P.; ARAUJO, J.D.M.; PESSOA, M.N.G.; ALBIERO, D.; MONTEIRO, L.A. Avaliação de extrato de melão-de-são-caetano como medida alternativa de controle a fungos fitopatogênicos. CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 7., 2011, Fortaleza. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.

SILVA, L.J.; SILVA, M.S.; SILVA, L.N.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.S.; ESPÍNDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N. Fungos fitopatogênicos de soja são sensíveis a extratos orgânicos de planta “fruta-do-conde”, nativa do cerrado do gênero *Annona* sp. (Família *Annonaceae*). In: SIMPOSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

SOYLU, S.; YIGITBAS,H.; SOYLU, E.M.; KURT, S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1021-1030, 2007.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 23, n.11, p. 16-21, 1999.

STEADMAN, J.R. White-mold – a serious yield-limited disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.

SUFFREDINNI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, .N. Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 400-402, 2006.

THAMIZHVANAH, K.; KUMAR, P.; BACHALA, T.; MOHAN, D.M.; KRISHNAKISHORE, P.; KUMAR, K.P. Antibacterial and antifungal activities of

various extracts of *Guettarda speciosa* L. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 1, n.1, p.20-22, 2010.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A.; SOUZA, F.R. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n. 1, p.89-95, 2011.

WHEELER, W.B.. Role of Research and Regulation in 50 Years of Pest Management in Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4151-4155, 2002.

YOUNG, C.S.; WERNER, C.P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled oilseed rape. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 730-738, 2012.

CAPITULO II

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS APLICADO EM SOLO SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO: Com o objetivo de identificar a proporção de solo e areia mais adequada para a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* e avaliar a ação de extratos e frações obtidas do particionamento de extratos vegetais aplicados em substrato solo e areia na proporção 1:1 sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*, foram conduzidos seis ensaios entre maio de 2010 e janeiro de 2012. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Foram testados os seguintes extratos e frações obtidas do particionamento dos extratos: *Palicourea crocea* (frações clorofórmica, hexânica e acetato de etila), *Annona cacans* (frações clorofórmica e acetato de etila), *Schinus terebinthifolius* (frações clorofórmica e acetato de etila). Foram testadas também as seguintes frações resultantes do particionamento dos extratos de plantas cultivadas: frações hexânica e acetato de etila de aveia, fração hexânica de feijão, fração diclorometânica de trigo e fração acetato de etila de ervilhaca. Os extratos foram aplicados sobre os escleródios no dia da instalação do ensaio e 30 dias após a instalação do ensaio. A germinação carpogênica foi maior no substrato solo e areia na proporção 1:1. Quando os extratos foram aplicados no dia da instalação do experimento, não houve diferença entre os tratamentos. Quando os extratos foram aplicados 30 dias após a instalação do ensaio, a germinação carpogênica foi menor nos tratamentos fração acetato de etila de ervilhaca e fração acetato de etila de *S. terebinthifolius*.

Palavras-chave: Mofa-branco, controle alternativo, germinação carpogênica

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS APPLIED IN SOIL ON
Sclerotinia sclerotiorum

ABSTRACT: Six assays were conducted to identify the proportion of soil and sand most suitable for germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and to assess the effect of plant extracts applied in soil on sclerotia carpogenic germination. Assesses were from May 2010 to January 2012. The experimental design was completely randomized. It was evaluated the extracts *Palicourea crocea*, *Annona cacans* and *Schinus terebinthifolius* and fractions chloroform, hexane and ethyl acetate of *Palicourea crocea*, fractions chloroform and ethyl acetate of *A. cacans*, and fractions chloroform and ethyl acetate of *S. terebinthifolius*. Fractions obtained of the partition of extracts of cultivated plants: hexane and ethyl acetate extracts of oats, beans hexane, dichlorometanic wheat and ethyl acetate of vetch were also evaluated. Extracts were sprayed on the sclerotia in two times, on the day of the experiments installations and 30 days after the installation. The carpogenic germination was higher in soil and sand proportion 1:1. When the extracts were applied 30 days after deposition on soil, carpogenic germination was lower in fraction ethyl acetate of vetch and fraction ethyl acetate *S. terebinthifolius*.

Key-words: White mold, alternative control, carpogenic germination

2.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como mofo branco, podridão branca ou podridão de esclerotínia, é um patógeno capaz de causar danos a várias espécies de plantas, sendo algumas delas de grande valor econômico, como feijão, soja, tomate e girassol. A doença foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1921 na cultura da batata, em 1958 foi relatada atacando a cultura do feijão e em 1976 atacando a cultura da soja (NAPOLEÃO et al., 2001).

Até a década de 90 o mofo branco era restrito ao sul do Brasil, ocorrendo esporadicamente em áreas de pivô central em Minas Gerais e Goiás, porém nos últimos anos tornou-se um dos maiores problemas para a cultura da soja (HENNING, 2011). Aproximadamente 12% da área cultivada com soja no Brasil está infestada por *S. sclerotiorum*, principalmente nas regiões de temperaturas amenas e a doença pode reduzir em até 40% a produtividade da cultura (MEYER, 2011). Devido à sua importância, a doença foi indicada como prioridade de pesquisa pela Comissão de Fitopatologia da Reunião de Pesquisa de Soja (REUNIÃO..., 2010).

Na soja, os sintomas ocorrem geralmente no terço médio das plantas, na haste principal, pecíolos, folhas e vagens. Com o progresso da doença, há formação de micélio e escleródios dentro e na superfície dos tecidos colonizados. Após a colheita, os escleródios retornam ao solo e sobrevivem por até 11 anos. Os escleródios germinam carpogenicamente, formando apotécios ou miceliogenicamente, com emissão de micélio (LEITE, 2005). O micélio não consegue infectar plantas que estão a mais de 2 cm da origem da infecção (HUANG e KOKO, 1992), entretanto os apotécios podem produzir grandes quantidades de ascósporos, que são disseminados a longas distâncias, e aderem-se aos tecidos vegetais, onde iniciam o processo de infecção na parte aérea das plantas (LEITE, 2005; NAPOLEÃO et al., 2001). A severidade do mofo branco é proporcional à densidade de inóculo do patógeno no solo, desta forma, o controle da doença é efetivo quando ocorre a redução do inóculo, ou seja, do número de escleródios no solo, com conseqüente diminuição do número de apotécios e da ejeção de esporos (GÖRGEN et al., 2010; MEYER, 2011), já que estes são considerados a principal fonte de inóculo de *S. sclerotiorum* (ADAMS e

AYERS, 1979; SUTTON e DEVERALL, 1983 citados por HUANG e KOKKO, 1992;).

A germinação carpogênica pode ser suprimida por resíduos de diferentes culturas e também por diferentes extratos vegetais (HUANG et al., 2007, MONTEIRO et al., 2012; REIS et al., 2011; SILVA et al., 2011). A maioria destes trabalhos foi conduzida em laboratório, com os escleródios imersos em ágar solidificado. Considerando que, a campo, os escleródios encontram-se no solo após a colheita, deveriam ser pesquisados os efeitos de extratos aplicados ao solo, condição mais próxima daquela encontrada no campo, para tanto, faz-se necessário identificar o substrato que proporcione maior germinação carpogênica.

Nesse contexto, objetivou-se, no presente trabalho, identificar a proporção de solo e areia mais adequada para a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* e avaliar a ação de extratos e fases obtidas do particionamento de extratos vegetais, aplicados ao substrato, sobre a germinação carpogênica de patógeno.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados seis ensaios no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de julho de 2009 a setembro de 2012, sendo um para identificar a proporção solo:areia mais apropriada para a germinação carpogênica e cinco para avaliar a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob extratos vegetais aplicados ao solo.

2.2.1 Obtenção, multiplicação e manutenção do inóculo

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram obtidos em área naturalmente infestada pelo patógeno no município de Chapadão do Sul, MS. Os escleródios foram produzidos a partir da repicagem do micélio do fungo para erlenmeyers contendo discos de cenoura previamente autoclavados, os frascos foram incubados a 25°C, em escuro pleno, por aproximadamente 30 dias. Após esse período, os escleródios formados foram retirados dos frascos, lavados em água corrente e armazenados a 5°C até a utilização dos mesmos nos experimentos.

2.2.2 Delineamento experimental e análise de dados

Todos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental foi constituída por uma caixa tipo gerbox contendo 20 escleródios. Os dados de germinação carpogênica (%) foram transformados em arco seno $\sqrt{(x+1)/100}$, e os demais dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$, para análise de variância e comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR. Os dados de germinação carpogênica foram submetidos à análise de regressão entre o tempo de incubação (dias) como fator independente e a germinação carpogênica (%) como variável dependente para os extratos testados.

2.2.3 Espécies vegetais

Folhas da espécie vegetal *Annona cacans* foram coletadas próximo a cidade de Dourados, MS. Folhas da espécie vegetal *Palicourea crocea* foram coletadas no Parque Ivinhema, no município de Ivinhema, MS. Folhas da espécie vegetal *Schinus*

terebinthifolius foram coletados no Horto de Plantas Medicinais da UFGD, no município de Dourados, MS. Estas espécies foram identificadas pela professora Dr. Zefa Valdevina Pereira e as exsicatas sob registro *A. cacans* (DDMS 3818), *P. crocea* (DDMS 4448) e *S. terebinthifolius* (DDMS 4602) encontram-se depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA/UFGD.

Folhas das espécies cultivadas aveia, ervilhaca, feijão e trigo foram coletadas na Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD, no município de Dourados, MS.

2.2.4. Preparação e fracionamento das espécies vegetais

O material vegetal de *A. cacans*, *P. crocea* e *S. terebinthifolius* foi desidratado em estufa de ar circulante à temperatura de 55°C e triturado em moinho de facas. O extrato metanólico foi obtido por maceração exaustiva com metanol.

O material vegetal das espécies cultivadas foi desidratado por 48 h em estufa com circulação de ar e temperatura de 55°C e triturado em moinho elétrico. O extrato etanólico foi obtido por percolação com etanol, a frio, por cinco dias.

Os extratos foram submetidos à particionamento líquido-líquido, com hexano, diclorometano, clorofórmico e acetato de etila, que com posterior evaporação dos solventes em rota evaporador resultaram nas frações hexânica, diclorometânica, clorofórmica e acetato de etila.

2.2.5 Identificação da proporção solo:areia mais adequada para a germinação carpopêgica

Foram testados cinco proporções de solo:areia (solo; areia; solo e areia na proporção 1:1; solo e areia na proporção 2:1; solo e areia na proporção 1:2) com 10 repetições. O tratamento testemunha foi ágar-água. O solo foi coletado na área da UFGD. O solo e a areia foram esterilizados por três dias consecutivos por 1 hora a temperatura de 120°C. Foi realizada a análise química do solo (Latosolo Vermelho Distroférrico) que revelou as seguintes características: pH (em H₂O) = 5,2; Al trocável (cmol_cdm⁻³) = 0,8; Ca + Mg (cmol_c dm⁻³) = 1,60; P – Mehlich 1 (mg dm⁻³) = 0,8; K (mg dm⁻³) = 0,08; matéria orgânica = 10,16 g kg⁻¹; V(%) = 19; m (%) = 32; soma de bases = 1,68 (cmol_c dm⁻³); CTCt = 8,9 (cmol_c dm⁻³); CTCe = 2,5 (cmol_c dm⁻³); argila = 872 g kg⁻¹; silte = 94 g kg⁻¹ e areia = 34 g kg⁻¹;

Uma camada de aproximadamente 2 cm do substrato foi acondicionada em caixas tipo gerbox (11,5 x 11,5 x 3,5 cm) e umedecida com 10 mL de água esterilizada. Sobre o substrato foram distribuídos 20 escleródios. As caixas gerbox foram lacradas e incubadas a 18°C com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro até o final do experimento.

As avaliações iniciaram-se a partir da verificação da emissão de estipes, onde foi enumerado o número total de escleródios com emissão de estipes e de apotécios e o número total de estipes e de apotécios por unidade experimental. Com base no número de escleródios com apotécios, foi calculada a porcentagem de germinação carpogênica. Foi considerada germinação carpogênica a formação de apotécios pelo escleródio.

2.2.6 Avaliação da germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*

Para a avaliação da germinação carpogênica sob extratos e frações obtidas do particionamento dos extratos vegetais aplicados no substrato solo:areia na proporção 1:1, foram realizados 6 ensaios. A aplicação do extrato ocorreu no dia da instalação do experimento, quando foi realizada a infestação do substrato ou 30 dias após a instalação do experimento (considerados como 0 d.a.i e 30 d.a.i). O número de tratamentos e de repetições variou para cada ensaio, conforme descrito no Quadro 1.

O substrato solo:areia na proporção 1:1, esterilizado conforme descrito no item 2.2.5, foi acondicionado em caixas tipo gerbox e umedecido a 70% da capacidade de campo. Sobre o substrato foram distribuídos 20 escleródios. A capacidade de campo do substrato foi verificada através do método do anel volumétrico com uso da mesa de tensão para determinar a macro e microporosidade do substrato, onde as amostras foram submetidas a uma tensão de 6Kpa, por 24h, sendo necessário adicionar 0,25g de água para cada 1g de substrato, para que o substrato atingisse 70% da capacidade de campo. Foi realizada a análise química do solo (Latosolo Vermelho Distroférico) que revelou as características descritas no item 2.2.5

Os extratos e frações obtidas do particionamento dos extratos foram dissolvidos em tubos de ensaio contendo água esterilizada e autoclavada. Após agitação dos tubos em agitador Vortex para a dissolução dos extratos, 10 mL da solução foi aplicada sobre os escleródios com o auxílio de um atomizador DeVilbiss (número 15) acoplado a um aspirador/compressor Fanem (modelo C.A.). A

concentração final dos extratos foi de 1000 ppm e das frações de 100 ppm. As avaliações foram realizadas conforme descrito no item 2.2.5.

QUADRO 1. Ensaios realizados para avaliar a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* sob extratos etanólicos e metanólicos de espécies vegetais

Ensaio	Tratamentos	Repetições	Aplicação (d.a.i)
1	Ervilhaca – fração acetato de etila	15	0
	Aveia – fração hexânica		
	Feijão – fração hexânica		
	Trigo – fração diclorometânica		
	Aveia – fração acetato de etila		
Testemunha			
2	Ervilhaca – fração acetato de etila	10	30
	Aveia – fração hexânica		
	Feijão – fração hexânica		
	Trigo – fração diclorometânica		
	Aveia – fração acetato de etila		
Testemunha			
3	<i>P. crocea</i>	5	0
	<i>P. crocea</i> – hexânica		
	<i>P. crocea</i> – clorofórmica		
	<i>P. crocea</i> – acetato de etila		
	<i>A. cacans</i>		
	<i>A. cacans</i> – clorofórmica		
	<i>A. cacans</i> – acetato de etila		
	<i>S. terebinthifolius</i>		
	<i>S. terebinthifolius</i> – acetato de etila		
Testemunha			
	Fungicida (i.a. Procimidone 150 g 100 L ⁻¹)*		
4	<i>P. crocea</i>	5	0
	<i>P. crocea</i> – hexânica		
	<i>P. crocea</i> – clorofórmica		
	<i>P. crocea</i> – acetato de etila		
	<i>A. cacans</i>		
	<i>A. cacans</i> – acetato de etila		
	<i>S. terebinthifolius</i>		
	<i>S. terebinthifolius</i> - clorofórmica		
	<i>S. terebinthifolius</i> – acetato de etila		
Testemunha			
	Fungicida (i.a. Procimidone 150 g 100 L ⁻¹)*		
5	<i>P. crocea</i>	10	30
	<i>P. crocea</i> – hexânica		
	<i>P. crocea</i> – clorofórmica		
	<i>P. crocea</i> – acetato de etila		
	<i>A. cacans</i>		

A. cacans – clorofórmica
A. cacans – acetato de etila
S. terebinthifolius
S. terebinthifolius - clorofórmica
S. terebinthifolius – acetato de etila
Testemunha
Fungicida (i.a. Procimidone 150 g 100 L⁻¹)*

* Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Identificação da proporção solo:areia mais adequada para a germinação carpogênica

No experimento para identificação da proporção solo e areia mais adequada para a germinação carpogênica dos escleródios, observou-se a emissão de estipes em todos os tratamentos aos 36 dias após incubação (DAI), com exceção dos substratos solo e solo:areia (2:1). Não foi observada formação de apotécios em nenhum dos tratamentos naquela avaliação. O maior número de escleródios com emissão de estipes foi observado no tratamento ágar-água. Nas avaliações subsequentes, o número de escleródios que apresentaram emissão de estipes foi maior nos tratamentos solo e areia (1:1) e solo e areia (1:2) (dados não apresentados). Os dados de germinação carpogênica foram submetidos à análise de regressão entre o tempo de incubação e a germinação carpogênica (%). Para todos os tratamentos, houve aumento linear da germinação carpogênica com o tempo de incubação (Figura 1).

Na avaliação realizada aos 43 DAI os substratos solo, solo:areia (2:1) e solo:areia (1:1) apresentaram o menor número de escleródios com emissão de apotécios. Nesta avaliação, a germinação carpogênica foi maior no tratamento ágar-água (27%), entretanto, nas avaliações seguintes, este tratamento apresentou menor germinação carpogênica, comparado a outros tratamentos, indicando que, nas condições deste experimento, o meio ágar-água proporciona um maior número de apotécios no início da incubação, mas com o passar do tempo, a velocidade da formação de apotécios tende a diminuir, quando comparada aos demais tratamentos (Quadro 2).

A partir das avaliações realizadas aos 56 DAI, a mistura solo e areia (1:1) e (1:2) apresentou a maior germinação. Aos 70 DAI, apenas 50% dos escleródios em ágar-água apresentavam germinação carpogênica, contra 98,6% e 94,6% dos tratamentos solo e areia nas proporções 1:1 e 1:2, respectivamente.

Apesar de não ter apresentado maior porcentagem de germinação neste trabalho, o substrato ágar-água proporcionou maior germinação carpogênica (89%), ao lado de areia grossa esterilizada e vermiculita em trabalho realizado por Reis et al. (2011). Monteiro et al. (2012) observaram que a mistura solo e areia na proporção

1:1 foi o substrato que apresentou maior porcentagem de escleródios germinados (100%), confirmando o resultado encontrado no presente trabalho.

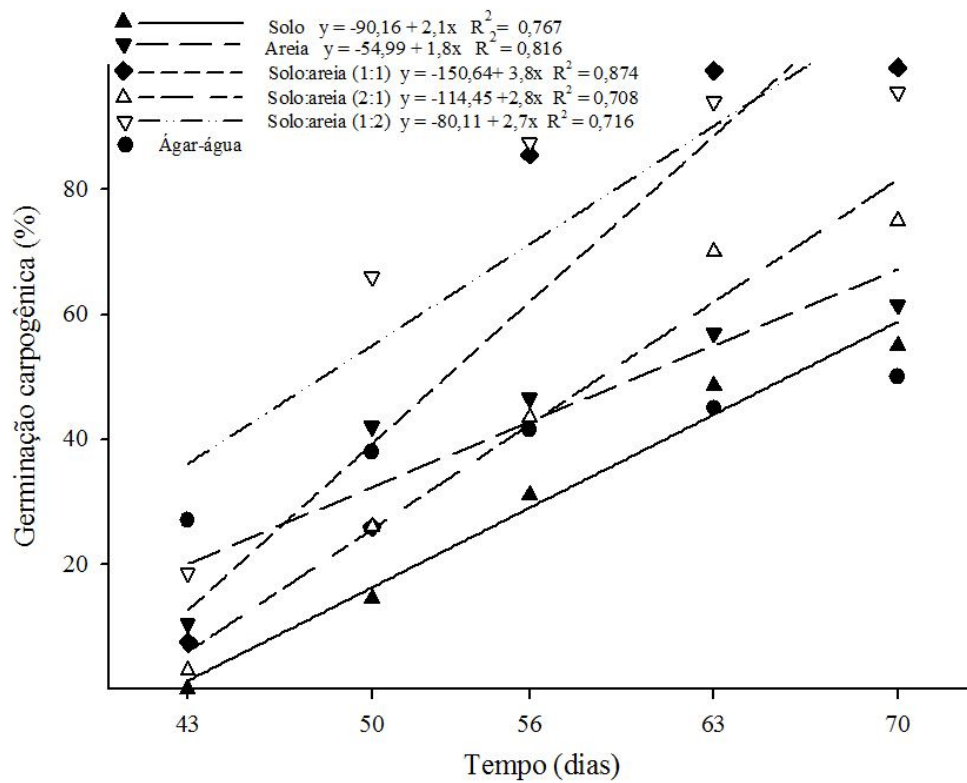


FIGURA 1. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob diferentes substratos em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 2. Germinação carpogênica (%) de escleródios de *S. sclerotiorum* sob diferentes substratos aos 43, 50, 56, 63 e 70 dias após incubação (DAI)

Substratos	Germinação carpogênica (%)				
	Dias após incubação				
	43	50	56	63	70
Solo	1 b	15 c	31 b	49 cd	55 dc
Areia	11 ab	42 ab	47 b	57 cd	62 dc
Solo e areia (1:1)	8 b	26 bc	86 a	98 a	99 a
Solo e areia (2:1)	3 b	26 bc	44 b	70 bc	75 bc
Solo e areia (1:2)	18 ab	66 a	87 a	93 ab	95 ab
Ágar-água	27 a	38 bc	42 b	45 d	50 d
CV (%)	46,9	39,4	63,0	32,3	33,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2 Avaliação da germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*

Nos ensaios em que os extratos foram aplicados no substrato infestado, observou-se que as fases obtidas do particionamento dos extratos de plantas cultivadas, quando aplicadas no dia da instalação do ensaio, não apresentaram diferenças significativas na germinação carpogênica dos escleródios. Para todos os tratamentos houve aumento da germinação carpogênica ao longo do tempo de incubação (Figura 2).

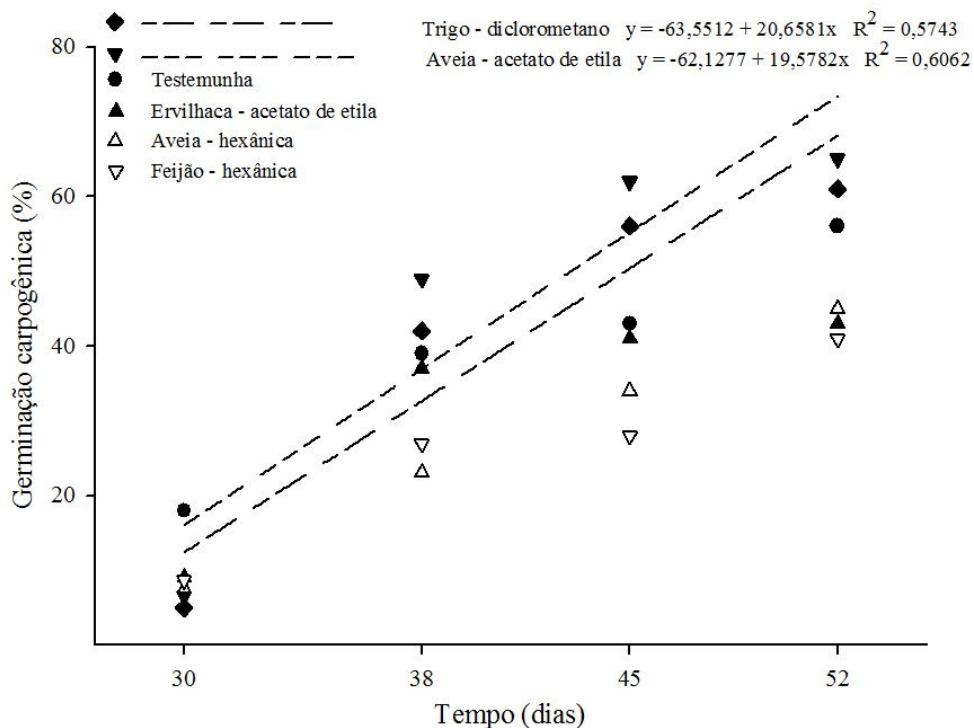


FIGURA 2. Germinação carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob diferentes frações (100 ppm) resultantes do particionamento de extratos etanólicos de plantas cultivadas, aplicadas no dia da instalação do ensaio em função do tempo (dias), após a incubação.

Quando a aplicação das frações obtidas do particionamento dos extratos de plantas cultivadas ocorreu 30 dias após a instalação do ensaio (Figura 3), a fração acetato de etila de ervilhaca proporcionou menor germinação carpogênica em relação à fração hexânica de aveia, aos 37 dias após a incubação. Aos 49 dias após incubação, a fração acetato de etila de ervilhaca proporcionou menor germinação carpogênica em relação às frações hexânica de aveia e de feijão e em relação à testemunha. Já aos 56 dias após incubação, sob a fração acetato de etila de ervilhaca, a germinação carpogênica menor, quando comparada à testemunha ou à fração hexânica de feijão. A inibição foi de 39 e 30%, em relação à testemunha para as avaliações realizadas aos 49 e 56 DAI, respectivamente (Quadro 3). Esta diferença em função da época da aplicação dos extratos pode ser devido à aplicação ser mais próxima à época de germinação dos escleródios, pois em todos os ensaios a emissão de apotécios ocorreu próximo aos 30 dias de incubação dos mesmos. Em trabalho conduzido por Silva et al. (2011), todas as fases utilizadas no presente ensaio

afetaram negativamente a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* em todas as épocas de avaliação, entretanto, tal trabalho foi conduzido em ágar-água. Tais resultados sugerem que o comportamento dos compostos presentes nos extratos e frações sobre a germinação carpogênica de escleródios pode ser diferente em função do substrato utilizado.

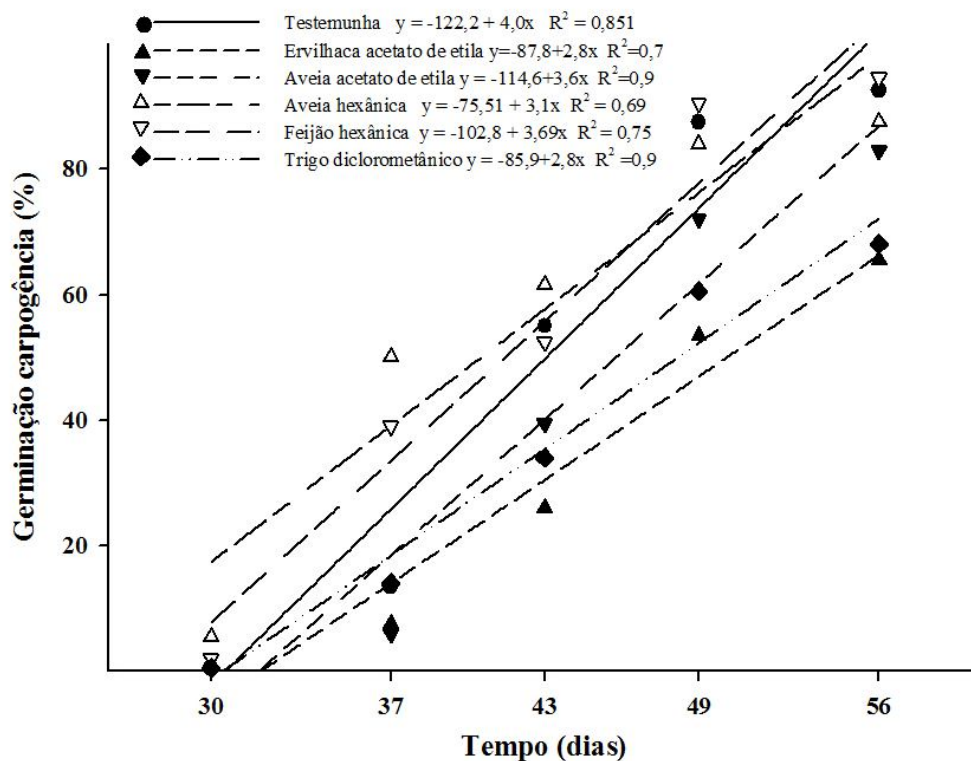


FIGURA 3. Germinação Carpogênica (%) de *S. sclerotiorum* sob frações (100 ppm) resultantes do particionamento de extratos etanólicos de plantas cultivadas, aplicadas 30 dias após a instalação do ensaio em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 3. Germinação carpogênica (%) de escleródios de *S. sclerotiorum* sob diferentes frações (100 ppm) resultantes do particionamento dos extratos etanólicos de plantas cultivadas, aplicadas aos 30 dias após instalação do ensaio, aos 37, 49, 56 dias após incubação (DAI)

Partição	Germinação carpogênica (%)		
	Dias após incubação		
	37	49	56
Aveia – hexânica	50 a	84 a	88 abc
Aveia – acetato de etila	6 b	72 ab	83 abc
Ervilhaca – acetato de etila	8 b	54 b	66 c
Feijão – hexânica	39 ab	91 a	95 a
Trigo – diclorometânica	14 ab	61 ab	68 bc
Testemunha	14 ab	88 a	93 ab
CV (%)	77,9	17,3	13,0

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No primeiro ensaio realizado com extratos e frações obtidas do particionamento de extratos vegetais aplicados no dia da instalação do ensaio (Figura 4), apenas na avaliação realizada aos 44 DAI, houve diferença significativa entre os tratamentos, onde a germinação carpogênica dos escleródios sob o extrato de *P. crocea* foi menor em relação à fração hexânica de *P. crocea* e às frações clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius*, que proporcionaram as maiores porcentagens de germinação carpogênica, 48, 56 e 49%, respectivamente (Quadro 4), mas nenhum dos tratamentos diferiu da testemunha. Para todos os tratamentos houve aumento constante da germinação carpogênica ao longo do tempo. O tratamento fungicida não diferiu da testemunha.

São escassos os trabalhos relacionados ao efeito de extratos de *P. crocea* sobre patógenos, entretanto, extratos aquosos de *Palicourea marcgravii* causaram mortalidade em pulgão preto do citrus superior a 50%, na concentração de 10mg/m e concentração de 50mg/m, a mortalidade foi de 100%, demonstrando o potencial inseticida dessa espécie (GONZAGA et al., 2008).

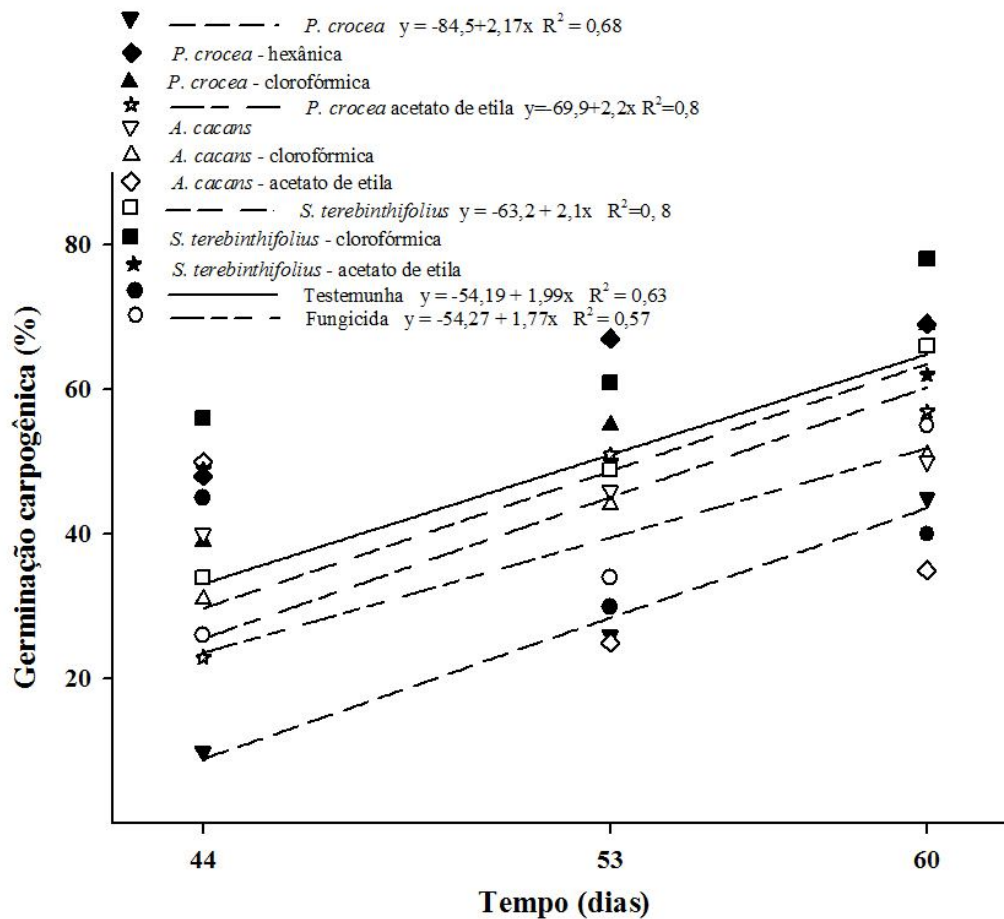


FIGURA 4. Germinação carpogênica (%) *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) e frações (100 ppm) resultantes do particionamento de extratos vegetais, aplicados no dia da instalação do ensaio em função do tempo (dias), após a incubação

QUADRO 4. Germinação carpogênica (%) de escleródios de *S. sclerotiorum* sob diferentes extratos metanólicos (1000 ppm) e frações (100 ppm) resultantes do particionamento dos extratos metanólicos de espécies vegetais, aplicados no dia da instalação do ensaio, aos 44 dias após incubação (DAI)

Extrato/Partição	Germinação carpogênica (%)
<i>P. crocea</i>	10 b
<i>P. crocea</i> – hexânica	48 a
<i>P. crocea</i> – clorofórmica	39 ab
<i>P. crocea</i> – acetato de etila	23 ab
<i>A. cacans</i>	40 ab
<i>A. cacans</i> – clorofórmica	31 ab
<i>A. cacans</i> – acetato de etila	35 ab
<i>S. terebinthifolius</i>	27 ab
<i>S. terebinthifolius</i> – clorofórmica	56 a
<i>S. terebinthifolius</i> – acetato de etila	49 a
Testemunha	34 ab
Fungicida*	26 ab
CV (%)	32,9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Concentração de 75 g i.a. L⁻¹

Este ensaio foi repetido, sem a fração clorofórmica de *A. cacans*, porém, em nenhuma das avaliações foi verificada diferença entre os tratamentos. Na primeira avaliação, realizada aos 28 DAI, todos os tratamentos já apresentavam estipes, mas nenhum deles apresentava formação de apotécios, somente na segunda avaliação, realizadas aos 35 DAI houve formação de apotécios (Figura 5).

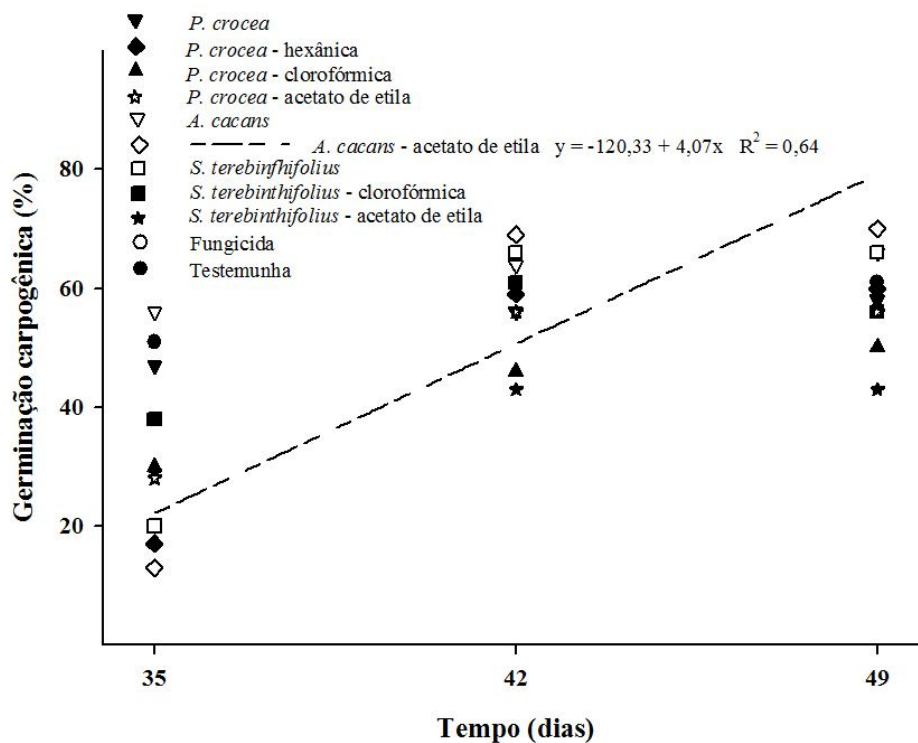


FIGURA 5. Germinação carpogênica (%) *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) e frações (100 ppm) resultantes do particionamento de extratos metanólicos de espécies vegetais, aplicados no dia da instalação do ensaio em função do tempo (dias), após a incubação.

No ensaio em que os extratos e frações foram aplicados aos 30 dias após a instalação do ensaio, houve aumento da germinação carpogênica ao longo do tempo (Figura 6). A análise de regressão dos tratamentos frações hexânica e clorofórmica de *P. crocea*, *A. cacans*, fração acetato de etila de *A. cacans*, e frações clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius* e o fungicida não foi significativa. A germinação carpogênica foi 88 e 76% menor no tratamento *S. terebinthifolius* fase acetato de etila em relação à testemunha nas avaliações realizadas aos 32 e 39 DAI, respectivamente (Quadro 5).

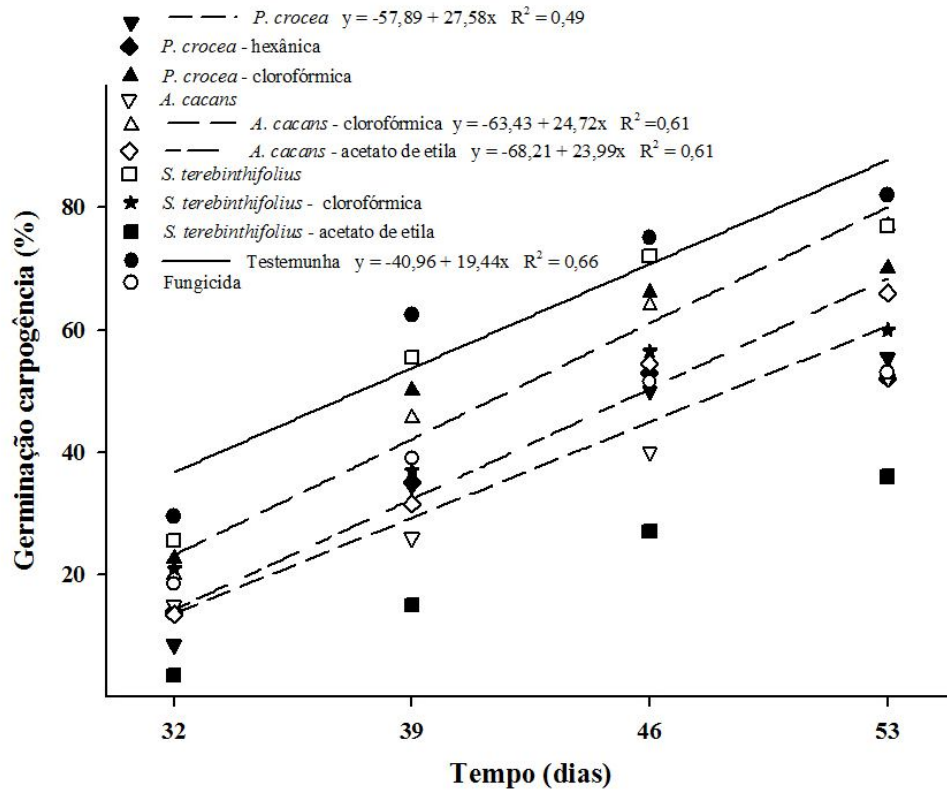


FIGURA 6. Germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* sob extratos metanólicos (1000 ppm) e frações (100 ppm) resultantes do particionamento dos extratos metanólicos de espécies vegetais, aplicados aos 30 dias após instalação do ensaio em função do tempo (dias), após a incubação.

QUADRO 5. Germinação carpogênica (%) de escleródios de *S. sclerotiorum* sob diferentes extratos metanólicos (1000 ppm) e fases (100 ppm) resultantes do particionamento de extratos metanólicos de espécies vegetais, aplicados aos 30 dias após instalação do ensaio, aos 32 e 39 dias após incubação (DAI)

Extrato/Partição	Germinação carpogênica (%)	
	Dias após incubação	
	32	39
<i>P. crocea</i>	15,0 ab	34,5 ab
<i>P. crocea</i> – hexânica	14,0 ab	35,0 ab
<i>P. crocea</i> – clorofórmica	22,5 ab	50,0 ab
<i>A. cacans</i>	15,0 ab	26,0 ab
<i>A. cacans</i> – clorofórmica	20,0 ab	45,5 ab
<i>A. cacans</i> – acetato de etila	13,5 ab	31,5 ab
<i>S. terebinthifolius</i>	22,5 ab	55,5 ab
<i>S. terebinthifolius</i> - clorofórmica	21,0 ab	37,0 ab
<i>S. terebinthifolius</i> - acetato de etila	3,5 b	15,0 b
Testemunha	29,5 a	62,5 a
Fungicida*	18,5 ab	39,0 ab
CV (%)	68,1	58,4

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * concentração de 75 g i.a. L⁻¹

O extrato de *A. cacans* apresentou atividade fungicida sobre o patógeno provavelmente devido aos compostos químicos já identificados em extratos de plantas da família Annonaceae como alcalóides, flavonóides, flavononas, triterpenóides, esteróides, flavonas, flavonóis, xantonas, saponinas, taninos, entre outros (BRITO et al., 2008; BALDIVIA et al. 2010). Os extratos hexânico e etanólico do caule de *Annona* sp. foram ativos contra *S. sclerotiorum*, demonstrando a atividade fungicida de compostos presentes nesta planta (ASSIS et al., 2008).

O extrato de *S. terebinthifolius* não foi eficiente em inibir a germinação do patógeno, mas a fração acetato de etila de *S. terebinthifolius* inibiu a germinação em mais de 90% em relação à testemunha, nas primeiras avaliações. Extratos de etanólicos de *S. terebinthifolius* inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum*

gloeosporioides em concentrações superiores a 2%, (LIMA et al., 2010) e o extrato aquoso de *S. terebinthifolius* na concentração de 15% inibiu em 25% o crescimento micelial de *Aspergillus nigrus* e em 79% a esporulação deste patógeno (SOUZA et al., 2009), o que comprova o efeito fungicida dessa espécie. Desta forma, maiores estudos envolvendo esta espécie devem ser realizados com o objetivo de identificar os compostos com ação fungicida presentes no extrato.

2.4 CONCLUSÕES

Escleródios de *S. sclerotiorum* apresentaram maior germinação carpogênica no substrato solo e areia na proporção 1:1.

Houve menor germinação carpogênica sob as frações acetato de etila de ervilhaca e de *S. terebinthifolius*, quando estas foram aplicadas aos 30 dias após a infestação do substrato.

A aplicação dos extratos e frações aos 30 dias após a instalação do ensaio apresenta maior efeito negativo sobre a germinação carpogênica dos escleródios do que aplicados no dia da infestação do ensaio.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS , P.B.; AYRES, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, v. 8, p. 896 – 899, 1979.

ASSIS, M.F.O.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, L.D.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.A.; ESPINDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N.A. Fungos fitopatogênicos de soja e algodão são sensíveis a extratos orgânicos de planta nativa do cerrado do gênero *Xylopia*, família *Annonaceae*. In: SIMPOSIO NACIONAL CERRADOS, 9., 2008, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

BALDIVIA, D.S.; CARVALHO, F.C.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H.; FORMAGIO, A.S.N. Potencial alelopático de espécies vegetais pertencentes a Annonaceae da região de Dourados-MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindóia. **Anais...** SBQ, 2010.

BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; FRANÇA, L.M.; BRITO, L.M.O.; PRADO, M.S.A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 89, n.3, p 180-184, 2008

GONZAGA, A.D.; GARCIA, M.V.B.; SOUSA, S.G.A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R.S.; RIBEIRO, J.D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2008.

GÖRGEN, C. A.; CIVARDI, E.A.; RAGAGNIN, V.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 10, p.1102 – 1108, 2010.

HENNING, A.A. Importância da colheita, beneficiamento e tratamento com fungicidas na sanidade de sementes e transmissão do mofo branco. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 11. Londrina, 2011. **Informativo Abrates**, v. 21, n. 3, p. 14, 2011.

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Pod rot of dry peas due to infection by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 76, n. 6, p. 597-600, 1992.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: EMBRAPA Soja. Londrina, 2005, 3p. (Comunicado Técnico, 76).

LIMA, N.B.; MARQUES, M.W.; CAIXETA, L.; NAUE, C.R. Avaliação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre o crescimento de *Colletotrichum*

gloeosporioides in vitro. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010.

MEYER, M.C. Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* para a sustentabilidade da produção. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 11. Londrina, 2011. **Informativo Abrates**, v. 21, n. 3, p. 15, 2011.

MONTEIRO, F.P.; PACHECO, L.P.; LORENZETTI, E.R.; ARMESTO, C.; SOUZA, P.E.; ABREU, M.S. Substrates and cover crop residues on the suppression of sclerotia and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 3, p.199-205, 2012.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LOPES, C.A.; NASSER, L.C.B. Mofobranco do feijoeiro irrigado no Cerrado. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.) **Manejo Integrado Fitossanidade** – Cultivo Protegido, Pivô Central e Plantio Direto. UFV: Viçosa, p.119-136, 2001.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; GAVA, F. MOREIRA, E.N.; SACHAS, C. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.10, n.2, p.145-150, 2011.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 38.,2010, CRUZ ALTA. **Atas e Resumos**. Cruz Alta: FUNDACEP, 2010. 215p.

SILVA, F.P.M.; GAVASSONI, W.L.; BACCHI, L.M.A.; GARCEZ, F.R. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 131-136, 2011.

SOUZA, L.S.; PEIXOUTO, Y.S.; SOARES, A.C.F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBM, 2010. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/pdf/cdsbm/resumos/R2419-1.html>>. Acesso em 24 out. 2012.

CAPITULO III

EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE FEIJOEIRO COMUM

RESUMO: Foram conduzidos dois ensaios na Universidade Federal da Grande Dourados, para avaliar o efeito de extratos metanólicos sobre as cultivares de feijoeiro comum IAPAR 81 e IPR Siriri, em casa de vegetação. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com 3 repetições. Os extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Palicourea crocea* e *Annona cacans* e as frações clorofórmica de *P. crocea* e clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius* e óleo essencial de *S. terebinthifolius* foram aplicados via pulverização sobre as plantas aos 30 dias após a sementeira. A concentração dos extratos e do óleo foi de 1000 ppm e das frações de 100 ppm. Sete dias após a aplicação foram realizadas as avaliações de altura de planta, número de folíolos por planta e fitotoxicidade. No primeiro ensaio, a altura das plantas foi menor sob a fração acetato de etila de *S. terebinthifolius*. As demais características avaliadas não apresentaram diferença entre os tratamentos. Constatou-se que os extratos não apresentaram fitotoxicidade nas cultivares de feijão avaliadas.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L; fitotoxicidade; alelopatia

EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON COMMON BEAN

ABSTRACT: Two experiments were conducted in greenhouse conditions, to evaluate the effect of methanol extracts on common bean cultivars IAPAR 81 and IPR Siriri. The two tests were conducted in a randomized block design with three replications. Methanol extracts of *Schinus terebinthifolius*, *Palicourea crocea* and *Annona cacans* and the fractions chloroform of *Palicourea crocea*, chloroform and ethyl acetate of *S. Terebinthifolius* and essential oil of *S. terebinthifolius* were sprayed on plants 30 days after sowing. Seven days after spraying plant height, number of leaves per plant and phytotoxicity were assessed. Plant height was lower in the extract of *S. terebinthifolius* - ethyl acetate. There was no effect in the other parameters. All extracts evaluated did not cause phytotoxicity in the common bean.

Key-words: *Phaseolus vulgaris* L; phytotoxicity; allelopathy

3.1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é altamente suscetível ao patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* Lib de Barry, causador da doença conhecida como mofo branco, principalmente nas condições de baixas temperaturas e solo úmido, como nos plantios irrigados por pivô central (LOBO JUNIOR et al., 2009). Segundo Ricardo et al. (2009), o dano econômico causado pelo mofo branco no feijoeiro pode chegar a R\$ 1.399,13 ha⁻¹.

A doença apresenta seus sintomas nas hastes, folhas e vagens e os tecidos afetados apresentam lesões encharcadas seguidas pela formação de micélio branco de aspecto cotonoso. Após alguns dias é verificada a formação de escleródios interna e externamente aos tecidos da planta. Os escleródios, além de serem as estruturas de sobrevivência do fungo, são também responsáveis pela produção do inóculo, uma vez que podem germinar carpogenicamente, formando apotécios e liberando os ascósporos (STEADMAN, 1983). Para que ocorra a infecção, o fungo necessita de uma fonte exógena de energia, que aparentemente é fornecida pelas flores do feijoeiro, desta forma, o controle químico da doença depende de uma boa cobertura das flores com o fungicida (STEADMAN, 1983; VIEIRA et al., 2001).

O controle da doença tem sido realizado por meio de uma aplicação de fungicida no início da floração (VIEIRA et al., 2001; NAPOLEÃO et al., 2001), entretanto a demanda por produtos livres de substâncias tóxicas tem incentivado a busca por produtos naturais, como óleos e extratos, que sejam eficientes no controle de doenças de plantas (CARNEIRO et al., 2007). Desta forma, a pesquisa tem se voltado à exploração de plantas superiores como fonte de compostos fungicidas uma vez que as plantas sintetizam compostos secundários, como fenóis, flavonóides, taninos e cumarinas, que apresentam ação antimicrobiana (GURJAR et al., 2012).

Metabólitos secundários de plantas consistem em compostos de baixo peso molecular, considerados como não essenciais para a manutenção da vida, mas cruciais para a sobrevivência do organismo produtor (HADACEK, 2002). A exploração da atividade biológica de compostos secundários de plantas pode constituir em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (STANGARLIN et al., 1999).

Trabalhos realizados com extratos ou óleos extraídos de plantas medicinais apontaram o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por ação fungitóxica direta quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com característica de elicitores (STANGARLIN et al., 1999). Smith (1996) define elicitores como moléculas de origem bióticas ou abióticas capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas.

O óleo de nim (*Azadirachta indica*) controlou o oídio do feijoeiro em aplicações realizadas antes e depois do surgimento de sintomas da doença e reduziu em mais de 50% o número de manchas nas folhas quando aplicados antes da inoculação. O número de manchas por folha e a severidade do oídio também foram reduzidas com a aplicação do extrato de sementes de nim (CARNEIRO et al., 2007).

Extratos de plantas também foram ativos contra *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose do feijoeiro. O crescimento micelial do patógeno foi reduzido com os extratos de *Myrcia fallax*, *Origanum vulgare*, *Siparuna arianae*, *Styrax pohlii* e *Miconia argyrophylla* e a germinação dos conídios foi reduzida com os extratos de *M. argyrophylla*, *Matayba elaeagnoides* e *Ocimum gratissimum* (PINTO et al., 2010).

Desta forma fica evidente a atividade fungicida de compostos presentes em extratos vegetais, entretanto, alguns compostos, como o extrato de nim, podem apresentar fitotoxicidade quando em altas concentrações, dependendo da espécie, idade e fase de desenvolvimento da planta (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005). A fitotoxicidade pode ser devido aos efeitos alelopáticos, já que a alelopatia é a influência de um indivíduo sobre o outro, podendo prejudicar o ou favorecer o segundo através de aleloquímicos produzidos pela planta (RICKLI et al., 2011). Chou e Kuo (1986), também sugerem que a fitotoxicidade de extratos vegetais sobre outras plantas é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição, originados do metabolismo secundário dos vegetais.

De acordo com Nishida et al. (2005), o termo alelopatia foi usado pela primeira vez por Molisch, em 1937, para designar o fenômeno onde substâncias liberadas por uma planta afetam o crescimento e o desenvolvimento de outra. Rice (1979) relata que os aleloquímicos podem ser encontrados em todas as partes dos vegetais: caule, folhas, raízes, inflorescências e flores, frutos e sementes. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos tem empregado folhas como principal fonte dessas substâncias. Assim, objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito de extratos

metanólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Palicourea crocea* e *Annona cacans*, do óleo essencial de *S. terebinthifolius* e das frações clorofórmica de *P. crocea* e das frações clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius* sobre plantas de feijoeiro.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, no período de julho a outubro de 2012. Foram realizados dois ensaios, o primeiro com a cultivar IAPAR 81 e o segundo com cultivar IPR Siriri, ambas de crescimento indeterminado. Foram utilizadas bandejas de polietileno (48 x 29 x 9cm) contendo 5,8 kg de latossolo vermelho distroférico coletado na área da UFGD. Foi realizada análise do solo utilizado como substrato que revelou as seguintes características: pH (em H₂O) = 5,2; Al trocável (cmol_cdm⁻³) = 0,8; Ca + Mg (cmol_c dm⁻³) = 1,60; P – Mehlich 1 (mg dm⁻³) = 0,8; K (mg dm⁻³) = 0,08; Matéria orgânica = 10,16 g kg⁻¹; V(%) = 19; m (%) = 32; Soma de bases = 1,68 (cmol_c dm⁻³); CTCt = 8,9 (cmol_c dm⁻³); CTCe = 2,5 (cmol_c dm⁻³); argila = 872 g kg⁻¹; silte = 94 g kg⁻¹ e areia = 34 g kg⁻¹. O solo foi adubado com a fórmula 00-20-20.

Foram semeadas quatro linhas com 14 sementes previamente tratadas com a mistura carbendazim + thiram (200 ml p.c. 100⁻¹ kg de sementes) em cada linha, após a emergência foi realizado o desbaste, restando oito plantas por linha. Para a avaliação, foram consideradas as quatro plantas centrais de cada linha. Cada bandeja representava duas parcelas. A irrigação era realizada a cada dois dias com 1 litro de água por bandeja. A semeadura ocorreu no dia 19 de julho de 2012 para o primeiro ensaio e no dia cinco de setembro de 2012 para o segundo ensaio.

Os tratamentos constaram da pulverização dos extratos metanólicos de *S. terebinthifolius*, *P. crocea* e *A. cacans* e as frações clorofórmica de *P. crocea* e clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius*. No segundo ensaio foi adicionado o tratamento óleo essencial de *S. terebinthifolius*. Na testemunha utilizou-se somente água. A concentração dos extratos foi de 1000 ppm para os extratos metanólicos e o óleo essencial e de 100 ppm para as frações provenientes do particionamento dos extratos.

Aos 30 dias após a semeadura os extratos metanólicos e as frações obtidas do particionamento dos extratos vegetais foram misturados em 100 mL de água destilada e posteriormente aplicados sobre todas as plantas da parcela, utilizando um pulverizador manual com gatilho para garrafa PET.

3.2.1 Espécies vegetais

Folhas de *A. cacans* foram coletadas próximo a cidade de Dourados, MS. A espécie *P. crocea* foi coletada no Parque Ivinhema, no município de Ivinhema, MS. Frutos e folhas de *S. terebinthifolius* foram coletados no Horto de Plantas Medicinais da UFGD, no município de Dourados, MS. As espécies foram identificadas pela professora Dr. Zefa Valdevina Pereira e as exsiccatas sob registro *A. cacans* (DDMS 3818), *P. crocea* (DDMS 4448), *S. terebinthifolius* (DDMS 4602) encontram-se depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA/UFGD.

3.2.2 Preparação, fracionamento e extração do óleo essencial das espécies vegetais

O material vegetal (folhas) das espécies foi desidratado em estufa de ar circulante à temperatura de 55°C e triturado em moinho de facas. O extrato metanólico foi obtido por maceração exaustiva com metanol.

Os extratos foram submetidos à particionamento líquido-líquido, com clorofórmico e acetato de etila, que com posterior evaporação dos solventes em rota evaporador resultaram nas frações clorofórmica e acetato de etila.

Para obtenção do óleo essencial, frutos de *S. terebinthifolius* foram submetidos à hidrodestilação em aparelho Clevenger, por quatro horas. O óleo essencial obtido foi lavado com hexano e seco com sulfato de sódio anidro.

3.2.3 Delineamento experimental e análise de dados

As variáveis analisadas foram altura de planta, medindo-se a distância da superfície do solo até o ápice das plantas; número de folíolos por planta e fitotoxicidade. A fitotoxicidade foi avaliada visualmente aos 37 dias após a semeadura, adotando-se a escala de avaliação visual de Frans (1972), que varia de 1 a 9, onde 1 significa ausência de sintoma e 9 morte da planta, conforme descrito por Fontes et al. (2010).

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade pelo programa SISVAR.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração acetato de etila de *S. terebinthifolius* proporcionou menor altura de plantas, quando comparados ao extrato de *S. terebinthifolius*, entretanto, não diferiram dos demais tratamentos nem da testemunha (Figura 1).

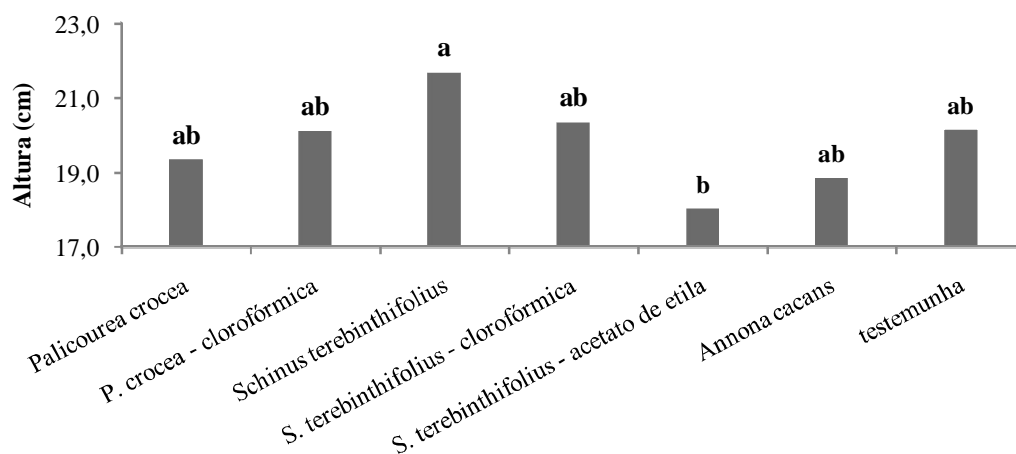


FIGURA 1. Altura de plantas de feijoeiro cv IAPAR 81 sob extratos metanólicos e frações obtidas do particionamento dos extratos, aplicados 30 dias após a semeadura.

Para as características número de folíolos e fitotoxicidade não houve diferença entre os tratamentos (Quadro 1). No segundo ensaio, além dos tratamentos do primeiro ensaio, foi acrescentado o óleo de *S. terebinthifolius*, mas nenhuma das características avaliadas apresentou diferença (Quadro 2).

QUADRO 1. Número de folíolos e fitotoxicidade em feijoeiro cv IAPAR 81, aos 37 dias após emergência, após aplicação de extratos metanólicos (1000 ppm) e frações (100 ppm) obtidas do particionamento dos extratos metanólicos de espécies vegetais

Extratos	Número de folíolos	Fitotoxicidade*
<i>Palicourea crocea</i>	9,5 ^{ns}	0,5 ^{ns}
<i>P. crocea</i> – fração clorofórmica	8,3	0,8
<i>Schinus terebinthifolius</i>	9,0	0,3
<i>S. terebinthifolius</i> – fração clorofórmica	10,8	1,1
<i>S. terebinthifolius</i> – fração acetato de etila	10,8	1,0
<i>Annona cacans</i>	10,8	1,1
Testemunha	11,0	0,5
CV (%)	11,7	101,9

^{ns} Médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Escala de avaliação visual de Frans (1972)

QUADRO 2. Altura de plantas, número de folíolos e fitotoxicidade em feijoeiro cv IPR Siriri, aos 37 dias após emergência, após aplicação de extratos metanólicos e óleo (1000 ppm) e frações (100 ppm) obtidas do particionamento dos extratos metanólicos de espécies vegetais

Extratos	Altura de plantas	Número de folíolos	Fitotoxicidade*
<i>Palicourea crocea</i>	19,54 ^{ns}	9,8 ^{ns}	0,5 ^{ns}
<i>P. crocea</i> – clorofórmica	20,67	9,3	0,3
<i>Schinus terebinthifolius</i>	19,08	11,0	1,1
<i>S. terebinthifolius</i> – clorofórmica	20,50	10,5	1,1
<i>S. terebinthifolius</i> – acetato de etila	19,00	10,8	1,0
<i>S. terebinthifolius</i> – óleo	20,00	10,8	0,7
<i>Annona cacans</i>	20,17	8,8	0,8
Testemunha	20,04	10,8	0,5
CV (%)	8,4	22,4	101,2

^{ns} Médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Escala de avaliação visual de Frans (1972).

Plantas de feijoeiro que receberam aplicação de extratos de *Nicotiana tabacum* na concentração de 10% (p/v) e DalNeem (produto comercial a base de nim) na concentração de 10% (v/v), apresentaram fitotoxicidade de 20 e 62%, respectivamente, mas extratos de cinamomo e jambolão não causaram fitotoxicidade nas plantas. O peso médio das vagens foi reduzido em 30 e 35% nos tratamentos a base de DalNeem e extrato de jambolão (DEQUECH et al., 2008). No presente trabalho não foi avaliado o peso das vagens, mas nenhum dos extratos causou fitotoxicidade às plantas.

O estudo dos efeitos alelopáticos de plantas sobre o estabelecimento (germinação e crescimento inicial) de feijoeiro tem sido objeto de estudo de vários autores, entretanto, poucos estudos são conduzidos para verificar a ação de extratos vegetais sobre a cultura estabelecida. Plantas de feijoeiro, soja e trigo com oito dias foram expostas à exsudatos de raiz de sorgo, com o objetivo de testar sua ação alelopática sobre as plantas. Os autores constataram um leve sintoma visual de fitotoxicidade, mas não houve diferença entre os tratamentos sobre o peso de matéria seca das plantas, indicando que as plantas de feijão foram mais resistentes aos exsudatos do que plantas de soja e de trigo (SOUZA et al., 1999). Em experimento para avaliar os efeitos alelopáticos de extratos vegetais sobre germinação e crescimento inicial de feijoeiro, Faria et al. (2009), verificaram que os extratos aquosos de milheto estimularam o comprimento de hipocótilo e o comprimento de radícula de feijão e diminuíram a porcentagem de germinação e a velocidade de emergência dessas plantas.

Embora extrato e óleo essencial de *S. terebinthifolius* não tenha causado fitotoxicidade ao feijoeiro, outros trabalhos indicam atividade alelopática desta planta. O extrato aquoso de *S. terebinthifolius* apresentou alelopátia na germinação de alface, com redução de 24 e 47% na porcentagem de germinação, e redução de 55 e 75% no índice de velocidade de emergência, para os extratos na concentração de 50% e 100%, respectivamente (SOUZA et al., 2007). Carpes et al. (2010) também verificaram que o extrato aquoso de *S. terebinthifolius* na concentração de 20% apresentou redução de 85% na germinação de alface quando comparado à testemunha.

Nesello et al. (2006) realizaram análise cromatográfica de óleo essencial proveniente de folhas de três espécimes de *S. terebinthifolius* e verificaram que cada

espécime apresentava compostos majoritários distintos. Os óleos que apresentaram maior efeito negativo tanto na porcentagem de germinação quanto no índice de velocidade de emergência foram os provenientes dos espécimes 1 e 3, demonstrando que a mesma espécie pode apresentar diferenças na sua composição. Como no presente trabalho o extrato metanólico de *S. terebinthifolius*, as fases clorofórmica e acetato de etila e o óleo essencial dessa planta não causaram fitotoxicidade às plantas de feijão, na concentração utilizada, sugere-se testar outras concentrações e realizar a análise cromatográfica dos extratos.

O efeito alelopático de espécies da família Annonaceae já foi descrito na literatura. Extrato metanólico das espécies de *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *A. sylvatica* na concentração de 1% apresentaram efeito alelopático sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (FORMAGIO et al., 2010). Silva et al. (2009) também verificaram que extrato de *A. coriacea*, nas concentrações de 1, 2 e 4 % apresentaram efeito negativo na porcentagem de germinação e no índice de velocidade de emergência de *Euphorbia heterophylla*, *Ipomea grandifolia* e *Brachiaria brizantha* sendo que esta última também foi afetada pelo extrato de *A. dioica*.

3.4 CONCLUSÕES

Extratos metanólicos de *S. terebinthifolius*, *A. cacans* e *P. crocea*, as frações clorofórmica e acetato de etila de *S. terebinthifolius* e clorofórmica de *P. crocea* e o óleo essencial de *S. terebinthifolius*, nas concentrações de 1000 ppm para os extratos e 100 ppm para as frações, não apresentaram fitotoxicidade ao feijoeiro.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E.C.; GOMES, J.C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CARPES, W.W.; LOPES, T.; BÜNDCHEN, M. Efeito alelopáticos de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. MOSTRA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA, 11., Porto Alegre, 2010, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia.

CHOU, C.H.; KUO Y.L. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan: III. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Journal of Chemical Ecology**, v.12, n. 6, p.1431-1448, 1986.

DEQUECH, S.T.B.; RIBEIRO, L.P.; SAUSEN, C.D.; EGEWARTH, R.; KRUSE, N.D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, v. 15, n.1, p.71-80, 2008.

FARIA, T.M.; GOMES JUNIOR, F.G.; SÁ, M.E.; CASSIOLATO, A.M.R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1625-1633, 2009.

FONTES, J.R.A.; GONÇALVES, J.R.P.; MORAIS, R.R. Tolerância do feijão-caupi ao herbicida oxadiazon. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 1, p.110-115, 2010.

FORMAGIO, A.S.N.; MASETTO, T.E.; BALDIVIA, D.S.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H.; PEREIRA, Z.V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

GURJAR, M.S.; ALI, S.; AKHTAR, M. SINGH, K.S. Efficacy of plant extracts in plant disease management. **Agricultural Sciences**, v. 3, n. 3, p. 425-433, 2012.

HADACEK, F. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 21, n. 4, p. 273- 322, 2002.

LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A.M.; CARVALHO, D.D.C. **Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA. 2009, 4 p. (Circular Técnica n. 85).

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n.1, p.139-148, 2005.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LOPES, C.A.; NASSER, L.C.B. Mofobranco do feijoeiro irrigado no Cerrado. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.) **Manejo Integrado Fitossanidade** – Cultivo Protegido, Pivô Central e Plantio Direto. UFV: Viçosa, p.119-136, 2001.

NESELLO, M.A.; PAULETTI, G., SANTOS, A.C.A. ATTI-SERAFINI, L. Efeito alelopático dos óleos essenciais de três espécimes de *Schinus terebinthifolius* sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>>

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187-1203, 2005.

PINTO, J.M.A.; SOUZA, E.A.; OLIVEIRA, D.F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v. 29, n. 8, p. 838-842, 2010.

RICARDO, T.R.; WANDER, A.E.; LOBO JUNIOR, M.; PICANÇO FILHO, A.F. Custos associados ao mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro comum de 3ª safra em Goiás – GO – Brasil. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre, **Anais eletrônicos ...** Brasília: SOBER, 2006. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/174.pdf>>

RICE, E.L. Allelopathy – an update. **The Botanical Review**, v. 45, n1, 1979.

RICKLI, H.C.; FORTES, A.M.T.; SILVA, P.S.S.; PILATTI, D.M.; HUTT, D.R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss em alface, soja, milho, feijão e picão-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n.2, p. 473-484, 2011.

SILVA, B.A.S.; INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; SANTANA, C.T.; POSSAMAI, A.C.S.; PEREIRA, K.M.. Investigação da atividade alelopática de *Annona coreacea* e *Annona dioica* sobre *Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 4, CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AGROECOLOGIA, 2., 2009, Curitiba. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 134-138, 2009.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, n. 1, p.1-45, 1996.

SOUZA, C.N.; SOUZA, I.F.; PASQUAL, M. Extração e ação de sorgolene sobre o crescimento de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n.3, p.331-338, 1999.

SOUZA, C.S.M.; SILVA, W.L.P.; GUERRA, A.M.N.; CARDOSO, M.C.R.; TORRES, S.B. Alelopátia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde**, v. 2, n. 2, p. 96-100, 2007.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 2, n.11, p.16-21, 1999.

STEADMAN, J.R. White-mold – a serious yield-limited disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.

VIEIRA, R.F.; PAULA JUNIOR, T.J.; PERES, A.P.; MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n.4, p. 770-773, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se que a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* foi menor sob os extratos metanólicos de *Palicourea crocea*, *Geophilla repens* e sob as frações acetato de etila e clorofórmica de *Annona cacans*, incorporados ao meio ágar-água.

Observou-se que o óleo de *Schinus terebinthifolius* em meio batata-dextrose-ágar, mesmo na maior concentração (1000 ppm), inibiu somente 10% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, não sendo indicado para controle deste patógeno.

A proporção solo e areia 1:1 foi o substrato que proporcionou maior germinação carpogênica dentre os substratos testados neste estudo e, portanto, pode ser utilizada em demais trabalhos que visem a germinação deste patógeno em condições semelhantes àsquelas encontradas no campo.

Quando os extratos e as frações foram aplicadas via pulverização no substrato solo:areia (1:1), observou-se menor germinação carpogênica quando a partição *Schinus terebinthifolius* fase acetato de etila e a partição ervilhaca fase acetato de etila foram aplicadas 30 dias após a instalação do experimento. Quando estes extratos foram aplicados no dia da instalação do experimento não houve alteração na germinação carpogênica dos escleródios.

Verificou-se que os extratos têm ação distinta quando incorporados ao meio ágar-água e quando aplicados sobre o substrato solo e areia (1:1) infestado, o que justifica futuros trabalhos para avaliar o controle do patógeno nestas condições.

Extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Annona cacans* e *Palicourea crocea*, as fases *S. terebinthifolius* clorofórmica e acetato de etila e *P. crocea* clorofórmica e o óleo essencial de *S. terebinthifolius* não apresentaram fitotoxicidade ao feijoeiro comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.899-904, 1979.
- ADAMS, P.B.; AYRES, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.896-899, 1979.
- ASSIS, M.F.O.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, L.D.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.A.; ESPINDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N.A. Fungos fitopatogênicos de soja e algodão são sensíveis a extratos orgânicos de planta nativa do cerrado do gênero *Xylopia*, família *Annonaceae*. In: SIMPOSIO NACIONAL CERRADOS, 9., 2008, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.
- BARDIN, S.D.; HUANG, M. H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n, 1, p.88-98, 2001.
- BOLLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n.1, p.1-16, 2006.
- BUTLER, M.J.; GARCINER, R.B.; DAY, A.W. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 296-304, 2009
- DIAS, A.R.; GUAZINA, R.A.; FERREIRA, C.B.; BALDASSO, T.B.; PRANDO, F.P.; VIEIRA, V.L.B.; DIAS, L.R.M. Controle químico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em algodão adensado cultivado na safrinha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 8., & COTTON EXPO, 1., 2011, São Paulo. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 361-367, 2011. (CD-ROM)
- DILLARD, H.R.; LUDWING, J.W.; HUNTER, J.E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, v. 79, n. 4. p. 411 – 415, 1995.
- DOMINGUES, R.J.; SOUZA, J.D.F.; TOFOLI, J.G., MATHEUS, D.R. Ação “in vitro” de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 643-649, 2009.
- FERRAZ, L.C.L. CAFÉ FILHO, A.C.; NASSER, L.C.B.; AZEVEDO, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 48, n. 1, p.77-82, 1999.

FIGUEIREDO, G.S. FIGUEIREDO, L.C. CAVALCANTI, F.C.N; SANTOS, A. C.; COSTA, A.F.; OLIVEIRA, N.T. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p.1-9, 2010.

GARCIA, R.A. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008, 154 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p.48-57, 2012.

GERALDINE, A.M.; LOBO JUNIOR, M.; MARCELI, H. Influência da temperatura e da umidade do solo na germinação carpogênica e parasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 2010, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.75, 2010.

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

GÖRGEN, C.A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* ‘1306’**. 2009, 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, Jataí-GO.

HAO, J.J.; SUBBARAO, K.V.; DUNIWAY, J.M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Phytopathology**, v. 93, n. 4, p.443-450, 2003.

HOLLEY, M R.C.; NELSON, B.D. Effect of plant population and inoculum density on incidence of *Sclerotinia* wilt of sunflower. **Phytopathology**, v. 76, n.1, p, 71-74, 1989,

LE TORNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 887-890. 1979.

LEE, S.E.; PARK, B.S.; KIM, M.K.; CHOI, W.S.; KIM, H.T.; CHO, K.Y.; LEE, S.G.; LEE, H.S. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 20, n.6, p. 523-528, 2001.

MELLO, A.F.S.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Alternative products in the “in vitro” inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*, Piracicaba, v. 62, n.2, p. 179-183, 2005.

MILA, A.L.; YANG, X.B. Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 92, n.1, p.78-82, 2008.

NAPOLEÃO, R. CAFÉ FILHO, A.C.; LOPES, C.A.; NASSER, L.C.B.; MAROUELLI, W.A. Efeito da frequência de rega e da umidade do solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 80-82, 2007.

PANSERA, M.R.; VICENÇO, C.B.; CONTE, R. I. ; SARTORI, V.C.; RIBEIRO, R.T.S. Controle alternativo da podridão branca da haste em plantas de soja, com a utilização de óleos essenciais de plantas nativas do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 2011, p. S587.

PATRICIO, F.R.A. Controle de doenças de hortaliças – convencional vs. alternativo. Palestra. **Biológico**, v. 69, n.2, p.87-90, 2007. RAIB, 20.

SILVA, F.P.M.; GAVASSONI, W.L.; BACCHI, L.M.A.; GARCEZ, F.R. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n.3, p. 131-136, 2011.

SILVA, L.J.; SILVA, M.S.; SILVA, L.N.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.S.; ESPÍNDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N. Fungos fitopatogênicos de soja são sensíveis a extratos orgânicos de planta “fruta-do-conde”, nativa do cerrado do gênero *Annona* sp. (Família *Annonaceae*). In: SIMPOSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

SOYLU, S.; YIGITBAS, H.; SOYLU, E.M.; KURT, S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1021-1030, 2007.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, n.11, p. 16-21, 1999.

SUN P.; YANG, X.B. Light, temperature and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287-1293, 2000.