

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

MARIA QUITERIA CARDOSO DOS SANTOS

**Caracterização de *Pythium cucurbitacearum*, e controle alternativo da podridão do colo
e das raízes do mamoeiro, grupo solo, cultivar Golden**

RIO LARGO

2015

MARIA QUITERIA CARDOSO DOS SANTOS

Caracterização de *Pythium cucurbitacearum*, e controle alternativo da podridão do colo e das raízes do mamoeiro, grupo solo, cultivar Golden

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim

RIO LARGO

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

| | |
|-------|--|
| S237c | <p>Santos, Maria Quiteria Cardoso dos.</p> <p>Caracterização de <i>Pythium Cucurbitacearum</i>, e controle alternativo da podridão do colo e das raízes do mamoeiro, grupo solo, cultivar Golden / Maria Quiteria Cardoso dos Santos. – 2015.</p> <p>96 f. : il.</p> <p>Orientadora: Edna Peixoto da Rocha Amorim.</p> <p>Tese (doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo-AL, 2015.</p> <p>Bibliografias: f. 93-96.</p> <p>1. <i>Carica papaya</i> L. 2. Tombamento. 3. Óleos essenciais. 4. Extratos vegetais. 5. Mecanismo de defesa. Molecular. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 634.651:581.2</p> |
|-------|--|

Folha de Aprovação

MARIA QUITERIA CARDOSO DOS SANTOS

Caracterização de *Pythium cucurbitacearum*, e controle alternativo da podridão do colo e das raízes do mamoeiro, grupo solo, cultivar Golden

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de maio de 2015.

Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim, Universidade Federal de Alagoas.

(Orientadora)

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Juliana Paiva Carnaúba Ramos, Instituto Federal de Alagoas

(Examinador Externo)

Dr.^a Claudiana Moura dos Santos, Pós-Doutorado/ PNPB – CECA, Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)

Prof.^a Dr.^a Iraildes Pereira Assunção, Universidade Federal de Alagoas

(Examinador Interno)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amaro Paulo dos Santos e Marileide Maria Cardoso dos Santos.

A quem devo todo respeito e amo imensamente.

A minha filhinha Maria Sofia Cardoso dos Santos Melo

Que tanto amo.

Ao meu Esposo Flavio de Araújo Barros Melo

Pelo carinho, amor e apoio.

Aos meus sobrinhos Arthur Felipe Cardoso dos Santos e Luan Ferreira Cardoso dos Santos

Aos meus irmãos Alan Cardoso dos Santos e Amaro Paulo dos Santos Junior

Pelo amor que nos une pela família que somos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois, sem ele nada do que foi feito se fez. Por toda graça e sabedoria a mim concebida;

À Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela oportunidade, amizade, ensinamentos e apoio para realização deste trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Iraildes Pereira Assunção pela contribuição ao realizar as correções e pelas sugestões;

À Dr.^a Juliana Paiva Carnaúba pela contribuição ao realizar as correções e pelas sugestões;

À Dr.^a Claudiana Moura dos Santos pela contribuição ao realizar as correções;

Aos Profs. Drs. Gaus Silvestre de Andrade Lima e Iraildes Pereira Assunção pelo apoio;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo para realização do curso;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, pelos ensinamentos;

Aos funcionários da Secretaria da pós-graduação, Geraldo de Lima, Marcos Antonio Lopes e Michele Cristina pela ótima convivência;

Aos amigos Leila de Paula Rezende, Jaqueline Figueiredo de Oliveira, Hully Monaísy Alencar Lima, Vanessa de Melo Rodrigues, Paulo Nogueira de Barros, Maria Erika Francisca de Sales Oliveira e Isabella Cardoso pela amizade e grande apoio dado ao trabalho;

Aos que fazem parte do Laboratório de Fitopatologia, em especial aos amigos Deyse Ferreira Rocha, Paulo Nogueira de Barros, Izael Oliveira Silva, Nelson Augusto do Nascimento Júnior, David Vitor, por todo apoio, amizade e ótima convivência;

Aos colegas e amigos da pós-graduação, Ellen Carine Neves Valente, Paulo Nogueira de Barros, Joseani Castro da Silva, Jaqueline Figueiredo de Oliveira, Deyse Ferreira Rocha, Danilo César Oliveira, Wellington Costa da Silva, Jorge Portella, Izael Oliveira Silva, Débora Teresa Ferreira, Clemens Rocha Fortes, Maria Lausanne Damasceno, Jakeline Maria dos Santos, Djison Silvestre dos Santos, e Andrezo Adenilton Santos, pelo excelente convívio durante a realização do curso;

RESUMO

O tombamento de plântulas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) causadas por espécies de *Pythium* já vem sendo notificado há algum tempo no mundo e recentemente no Brasil. A doença pode levar a cultura danos irreversíveis, comprometendo o seu desenvolvimento. A implementação de um método alternativo de controle, com o uso de produtos naturais pode surgir como uma solução viável durante o processo de produção de mudas. Este trabalho objetivou caracterizar molecular e morfológicamente a espécie de *Pythium cucurbitacearum* e avaliar o efeito dos produtos naturais na inibição *in vitro* do patógeno, e no controle da podridão radicular através da indução de resistência em mudas de mamoeiro. Para tanto, experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL). No primeiro experimento, estudou-se a espécie de *Pythium*, causadora da podridão do colo e das raízes do mamoeiro grupo solo, cultivar Golden, a partir da caracterização molecular e morfológica, patogenicidade, virulência em diferentes hospedeiros e estabelecimento de meios de cultura para um bom desenvolvimento micelial do patógeno. Posteriormente, em um segundo experimento, avaliou-se a atividade antifúngica, incorporando ao meio CA (Cenoura e Ágar), diferentes concentrações de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e eucalipto glóbulos (*Eucalyptus globulus* L.), o indutor Ecolife[®], extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) e óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) emulsificado, obtido a partir da extração a frio de sementes (Natuneem[®]). O terceiro experimento avaliou o potencial dos produtos alternativos testados *in vitro* em doses selecionadas para controlar nas condições de viveiro as mudas de mamoeiros infectadas por *Pythium cucurbitacearum*. Baseado nos melhores resultados da ação dos produtos, foi realizado um ensaio em mudas de mamoeiro com 60 dias de idade, a fim de avaliar a ação dos produtos alternativos e do ácido LD β-amino-n-butírico (BABA), na atividade de enzimas relacionadas com a indução de resistência em folhas de mamoeiro, através do incremento da atividade das enzimas Peroxidase (POX) e Fenilalanina Amonia-Liase (FAL), relacionadas com as respostas de defesa vegetal. Os resultados obtidos mostraram 100% de similaridade genética do patógeno estudado com a espécie *Pythium cucurbitacearum*, através do estudo filogenético baseado na região Cox1 do DNA construído usando o método de “maximum Likelihood Tree” com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. O isolado mostrou-se patogênico aos frutos e as plantas de mamão, apresentou virulência em diferentes hospedeiros. Os meios de cultura BDA, CA, V8, CMA, CFMA e FMA proporcionaram bom desenvolvimento a espécie de *Pythium* estudada. Os óleos essenciais testados, o indutor Ecolife[®], o extrato aquoso de alho e o produto comercial Natuneem[®], mostraram-se eficientes no controle *in vitro* de *Pythium cucurbitacearum*. O óleo essencial de hortelã-pimenta e o indutor Ecolife[®] mostraram controle sobre a podridão das raízes nas mudas de mamoeiros. O óleo essencial de hortelã-pimenta aumentou a atividade de POX, apresentando pico enzimático nas folhas coletadas após 72 horas da inoculação. A atividade da FAL aumentou nas folhas coletadas 24 horas após a inoculação, nas plantas tratadas com Água Destilada Esterilizada (ADE) e com o indutor Ecolife[®]. Também foi observado incremento da FAL 96 horas após a inoculação, nas plantas pulverizadas com o indutor BABA.

Palavras-chave: *Carica papaya* L. Tombamento. Molecular. Óleos essenciais. Extratos vegetais. Mecanismo de defesa.

CHARACTERIZATION OF *Pythium cucurbitacearum*, AND ALTERNATIVE CONTROL OF THE STEM ROT AND PAPAYA TREE ROOTS, SOIL GROUP, CULTIVATE GOLDEN

ABSTRACT

The damping-off of seedlings of papaya (*Carica papaya* L.) caused by species of *Pythium* has already been notified sometime in the world and recently in Brazil. The disease can lead to irreversible damage Culture, compromising its development. The implementation of an alternative control method with the use of natural products can arise as a viable solution for the production of the seedlings. This study aimed to characterize molecular and morphological species of *Pythium cucurbitacearum* and evaluate the effect of the products in the *in vitro* inhibition of the pathogen, and in control of root rot through the induction of resistance in papaya, seedlings, soil group, Golden cultivar. To this end, experiments were conducted in the Laboratories of Plant Pathology and Plant Pathology Molecular and and Plant Physiology of Center Agrarian Sciences, Federal University of Alagoas (CSA/UFAL). In the first experiment, we studied the species of *Pythium*, causal agent of stem rot and in roots of papaya, Soil group, cultivar Golden, from molecular and morphological characterization, pathogenicity, virulence in different hosts and establishment of culture media for mycelial growth of the pathogen. Later, in a second experiment, we evaluated the antifungal activity, incorporating the medium CA (Carrot and Agar), different concentrations of essential oils of peppermint (*Mentha piperita* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* L.) and eucalyptus globules (*Eucalyptus globulus* L.), the inductor Ecolife[®], aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) and neem (*Azadirachta indica* A. Juss) emulsified, obtained from cold extraction of seeds (Natuneem[®]). The third experiment evaluated the potential of alternative products tested *in vitro* in selected doses to control in nursery conditions the papaya seedlings infected by *Pythium cucurbitacearum*. Based on the best results from the action of the products, it was performed a test in papaya seedlings with 60 days of age in order to evaluate the action of alternative products and LD β -amino-n-butyric acid (BABA), in activity of enzymes related to the induction of resistance in papaya leaves, by increasing activity enzyme Peroxidase (POX) and Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL), related with to plant defense responses. The results showed 100% genetic similarity of pathogen studied with the species *Pythium cucurbitacearum*, by phylogenetic analysis based on the Cox1 of DNA region constructed using the method of 'maximum likelihood tree' based on 1000 replicates the "bootstrap". The isolate was shown to be pathogenic to fruits and papaya plants showed virulence in different hosts. The means of culture PDA, CA, V8, CMA, CFMA and FMA provided good development of *Pythium* species studied. The essential oils tested, the inductor Ecolife[®], the aqueous extract of garlic and the commercial product Natuneem[®], Were effective in the *in vitro* control of *Pythium cucurbitacearum*. The essential oil of peppermint and inductor Ecolife[®] they had control of root rot in papaya. The essential oil of peppermint increased POX activity, with enzymatic peak in leaves collected 72 hours after the inoculation. The activity of PAL rose in the leaves collected at 24 hours after inoculation in the plants treated with the WDE and inductor Ecolife[®]. Increase of the enzyme was also observed PAL 96 hours after inoculation in the plants with the inductor BABA.

Keywords: *Carica papaya* L. Damping-off. Molecular. Essential oils. Plant extracts. Defense mechanism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Área implantada com mamoeiro, com algumas plantas tombadas (A); Planta de mamão tombada (B); Sistema radicular com sintoma típico de podridão (C) | 40 |
| Figura 2 - | Inoculação de <i>Pythium cucurbitacearum</i> em frutos de mamão. Fruto inoculado com isolado do patógeno (A); frutos inoculados mantidos em câmara úmida (B)..... | 41 |
| Figura 3 - | Mudas de mamão com 45 dias de idade (A); ferimento no caule (B); inoculação de disco de BDA contendo micélio de <i>Pythium cucurbitacearum</i> (C); Copos em placas de Petri com água e um chumaço de algodão úmido (D)..... | 42 |
| Figura 4 - | Mudas de mamoeiro aos 45 dias de idade. Sistema radicular imerso em uma suspensão homogeneizada em liquidificador composta por micélio em 200 mL de ADE (A); transplante das mudas inoculadas para vasos de 400 mL (B); plantas inoculadas replantadas (C)..... | 43 |
| Figura 5 - | Estruturas propagativas de <i>Pythium cucurbitacearum</i> , esporângios (A-C); oósporos (D-E); oogônio com anterídio (F)..... | 47 |
| Figura 6 - | Fruto de mamão com aspecto de podridão aquosa, com crescimento cottonoso de coloração esbranquiçada, após quatro dias da inoculação..... | 48 |
| Figura 7 - | Planta de mamoeiro em desenvolvimento no viveiro aos dez dias após a inoculadas, apresentando lesão no colo (A); detalhe da lesão (B)..... | 49 |
| Figura 8 - | Planta de mamoeiro aos quatro dias após a inoculação. Sintoma de murcha (A); sistema radicular lesionado (B); planta tombada (C)..... | 49 |
| Figura 9 - | Frutos inoculados com o isolado de <i>Pythium cucurbitacearum</i> obtido de mamoeiro com sintomas de podridão de colo, após quatro dias de inoculação: (a) fruto de mamão (<i>Carica papaya</i> L.); (b) melão (<i>Cucumis melo</i> L.); (c) tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.); (d) pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.); (e) batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.) | 51 |
| Figura 10 - | Aspecto das colônias de <i>Pythium</i> sp. aos dez dias, em diferentes meios de cultura: BDA (A); CA (B); V8 (C); CFMA (D); FMA (E) e CMA (F)..... | 53 |
| Figura 11 - | Árvore filogenética baseada na região citocromo c oxidase subunidade I (Cox1) do DNA, do isolado de <i>Pythium</i> (MC1A), construída usando o método de “maximum Likelihood Tree”. O isolado <i>Phytophthora drechsleri</i> foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,1 e valores de suporte de bootstrap de 1000 repetições são apresentados nos ramos..... | 54 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 12 - | Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 69 |
| Figura 13 - | Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i> L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 69 |
| Figura 14 - | Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 70 |
| Figura 15 - | Efeito de diferentes concentrações de Ecolife® na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 70 |
| Figura 16 - | Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de alho (<i>Allium sativum</i> L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 72 |
| Figura 17 - | Efeito de diferentes concentrações do óleo comercial Natuneem® na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 72 |
| Figura 18 - | Efeito de óleos essenciais de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.); citronela (<i>Cymbopogon nardus</i> L.); eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> L.); indutor Ecolife® e extrato aquoso de alho (<i>Allium sativum</i> L.), sobre a incidência de <i>Pythium cucurbitacearum</i> em mudas de mamoeiro..... | 86 |
| Figura 19 - | Atividade de peroxidase (POX) em folhas de mamoeiros induzidas com ácido LD β-amino-n-butírico (BABA), Ecolife®, Óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.), e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 88 |
| Figura 20 - | Atividade de fenilalanina-amônia liase (FAL) em folhas de mamoeiros induzidas com, BABA, Ecolife®, óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.), e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 90 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Espécies de <i>Pythium</i> obtidos do GenBank usados para este estudo..... | 47 |
| Tabela 2 - | Média do diâmetro das lesões (cm) causadas pela infecção cruzada do isolado de <i>Pythium cucurbitacearum</i> em diferentes hospedeiros..... | 53 |
| Tabela 3 - | Médias dos diâmetros das colônias de <i>Pythium cucurbitacearum</i> em seis meios diferentes, após 96 horas de cultivo..... | 54 |
| Tabela 4 - | Efeito da interação de óleos essenciais e Ecolife® sob diferentes concentrações ($\mu\text{L. mL}^{-1}$), na porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 68 |
| Tabela 5 - | Efeito da interação do extrato aquoso de alho (<i>Allium sativum</i> L.) e Natuneem® sob diferentes concentrações (%), na porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 72 |
| Tabela 6 - | Modo de ação dos produtos testados que apresentaram inibição total do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 75 |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 A cultura do mamoeiro | 18 |
| 2.2 Problemas fitossanitários na cultura do mamão | 19 |
| 2.3 O Patógeno <i>Pythium</i> sp..... | 20 |
| 2.4 Caracterização molecular..... | 21 |
| 2.5 Controle da doença | 22 |
| 2.5.1 Controle alternativo com óleos essenciais e extratos vegetais | 22 |
| 2.6 Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos | 25 |
| REFERÊNCIAS..... | 28 |
| 3 ESTUDO DA PODRIDÃO DO COLO E DAS RAÍZES DO MAMOEIRO (<i>Carica papaya</i> L.): CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 36 |
| RESUMO | 36 |
| ABSTRACT | 37 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 38 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 3.2.1 Local de execução dos experimentos | 39 |
| 3.2.2 Isolamento da espécie e incidência da doença em campo..... | 39 |
| 3.2.3 Identificação do isolado e caracterização morfológica | 40 |
| 3.2.4 Teste de patogenicidade e reisolamento de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 41 |
| 3.2.5 Patogenicidade de <i>Pythium cucurbitacearum</i> em diferentes hospedeiros | 43 |
| 3.2.6 Caracterização morfofisiológica | 43 |
| 3.2.7 Caracterização molecular | 44 |
| 3.2.7.1 Extração de DNA..... | 44 |
| 3.2.7.2 Sequenciamento da região Cox1 análise filogenética do isolado | 45 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 46 |
| 3.3.1 Incidência da doença no campo..... | 46 |
| 3.3.2 Identificação e caracterização morfológica do isolado | 46 |
| 3.3.3 Patogenicidade..... | 48 |
| 3.3.4 Patogenicidade em diferentes hospedeiros | 50 |
| 3.3.5 Caracterização morfofisiológica | 52 |

| | |
|--|----|
| 3.3.5.1 Influencia dos meios de cultura sobre o aspecto das colônias e crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> . | 52 |
| 3.3.6 Caracterização molecular | 54 |
| 3.3.6.1 Amplificação do DNA, purificação e sequenciamento dos produtos da PCR | 54 |
| 3.4 CONCLUSÕES | 56 |
| REFERÊNCIAS | 57 |
| 4 EFICIÊNCIA DE PRODUTOS ALTERNATIVOS E INDUTOR DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE <i>IN VITRO</i> DE <i>Pythium cucurbitacearum</i> , CAUSADOR DA PODRIDÃO DA RAIZ E DO COLO DO MAMOEIRO (<i>Carica papaya</i> L.) | 60 |
| RESUMO | 60 |
| ABSTRACT | 61 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 62 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 4.2.1 Local de execução dos experimentos | 63 |
| 4.2.2 Obtenção dos produtos alternativos | 63 |
| 4.2.3 Efeito dos produtos sob o crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 64 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 4.3.1 Inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> com óleos essenciais e Ecolife® | 65 |
| 4.3.2 Inibição do crescimento micelial de <i>Pythium cucurbitacearum</i> com extrato aquoso de alho e Natuneem® | 71 |
| 4.3.3 Modo de ação dos produtos | 73 |
| 4.4 CONCLUSÕES | 75 |
| REFERÊNCIAS | 76 |
| 5 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE A PODRIDÃO RADICULAR EM MUDAS DE MAMOEIRO OCACIONADA POR <i>Pythium cucurbitacearum</i> , E QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS A DEFESA VEGETAL | 80 |
| RESUMO | 80 |
| ABSTRACT | 81 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 82 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 83 |
| 5.2.1 Local de execução dos experimentos | 83 |
| 5.2.2 Avaliação <i>in vivo</i> de produtos alternativos no controle da podridão do colo e das raízes, causada por <i>Pythium cucurbitacearum</i> | 83 |

| | |
|--|----|
| 5.2.3 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de mamoeiro | 84 |
| 5.2.3.1 Obtenção do extrato proteico | 84 |
| 5.2.3.2 Determinação da atividade de POX..... | 85 |
| 5.2.3.3 Determinação da atividade de FAL | 85 |
| 5.2.3.4 Quantificação de proteínas..... | 85 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 86 |
| 5.3.1 Incidência da doença..... | 86 |
| 5.3.2 Atividade enzimática | 88 |
| 5.4 CONCLUSÕES | 92 |
| REFERÊNCIAS..... | 93 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é cultivado praticamente em todo Brasil, desde o Norte até o Sul do País, entretanto, a região Nordeste merece destaque com uma produção de 978.140 toneladas, numa área colhida de 19.388 ha, totalizando mais de 60% da produção nacional. No estado de Alagoas, dados de 2013 indicam que a área colhida foi de 186 ha com produção de 6.968 toneladas e um rendimento de 37,46 t/ha (IBGE, 2014).

Os frutos do mamoeiro apresentam grande aceitação de mercado e é muito consumido na forma *in natura* ou industrializado. O mamão é também importante fonte de papaína, enzima proteolítica empregada para os mais variados fins nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (DANTAS et al., 2013).

Na cultura do mamoeiro alguns pontos devem ser considerados, a fim de melhorar resultados de produção. Dentre esses, pode-se destacar alguns cuidados com fitopatógenos, visto que, o mamoeiro sofre o ataque de diferentes agentes etiológicos de relevante importância para a cultura. Diversas doenças já foram relatadas, dentre elas, destaca-se o tombamento e a podridão do pé, que pode ser causada por *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora palmivora*, *Pythium aphanidermatum* e *Pythium* sp. (CAMPOS, 2008; CARNAÚBA et al., 2006; DIANESE et al., 2007; KOFFI et al., 2010).

O tombamento causado por espécies de *Pythium* em mamoeiro já foi descrito em diferentes Países (OLUMA; OLADIRAN, 1993; ALVARADO, 2001; KOFFI et al., 2010). No Brasil, *Pythium* sp., já foi notificado nos estados do Ceará e Pará como sendo agente etiológico responsável pela podridão do colo, estiolamento e tombamento de mudas de mamão (BARRETO; SANTOS, 2002; RITZINGER; SOUZA, 2000; COSTA et al., 2007).

O tombamento e a podridão do pé normalmente ocorrem em plantas jovens ainda no viveiro, durante o processo de produção de mudas, comprometendo a implantação e estabelecimento da cultura no campo, uma vez que, mudas saudáveis e vigorosas, asseguram um pomar com alto potencial de produtividade e qualidade dos frutos (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo Michereff; Andrade; Peruch (2005), o controle do tombamento causado por *Pythium* spp. é realizado por fungicidas, como o Fosetyl-Al e o Metalaxyl, sendo os mais recomendados pela eficiência apresentada. Entretanto, o surgimento da resistência do patógeno é uma das desvantagens da sua utilização.

De uma maneira geral, custos elevados da prática do controle químico, associado ao surgimento de resistência aos produtos comumente empregados, bem como a proibição do uso

de outros produtos, como o brometo de metila, torna essencial o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle.

O controle alternativo com substâncias obtidas a partir de produtos naturais já vem sendo estudado há algum tempo com o desígnio de controlar fitopatógenos. Essa estratégia vem sendo bem vista devido ao atual interesse mundial de utilizar produtos menos agressivos ao ambiente, promovendo assim, a sustentabilidade agrícola (SOUSA et al., 2012; SILVA; MELO, 2013). Segundo Stadnik; Talamini (2004); Silva et al. (2009), os produtos naturais de plantas podem apresentar três atividades principais: antimicrobiana, com ação direta sobre o patógeno; indutores de resistência, ativando os mecanismos de defesa da planta através de moléculas bioativas; e também como bioestimulantes do crescimento da planta.

Dessa maneira, considerando que o patógeno em questão apresenta problemas consideráveis a cultura do mamoeiro, e que o uso de produtos naturais vem sendo estudado com êxito no controle de patógenos causadores de doenças de plantas, o objetivo do trabalho foi caracterizar a espécie de *Pythium*, avaliar a virulência do patógeno em diferentes hospedeiros e avaliar a capacidade dos produtos naturais na inibição *in vitro* do patógeno, e no controle da podridão radicular através da indução de resistência em mudas de mamoeiro, grupo solo, cultivar Golden.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma fruteira que pertence à classe das dicotiledôneas, família Caricaceae a qual possui seis gêneros. Dentre esses, o gênero *Carica* possui uma única espécie, a *C. papaya*, que corresponde ao mamoeiro cultivado comercialmente (DANTAS et al., 2013).

O centro de origem do mamoeiro é provavelmente o Noroeste da América do Sul, vertente oriental dos Andes, mais precisamente a Bacia Amazônica Superior, onde sua diversidade genética é máxima, estendendo-se até a América Central e sul do México (DANTAS et al., 2013). De acordo com Serrano; Cattaneo (2010), após a descoberta, o mamoeiro foi amplamente distribuído em várias regiões tropicais, e provavelmente sua introdução no Brasil se deu em 1587.

De acordo com Souza (2013), o mamão é a quarta fruta tropical em importância econômica, e a segunda entre as frutas de origem neotropical. Os frutos são consumidos principalmente na forma *in natura*, contudo, diversos produtos são produzidos, sendo os principais, a polpa ou purê, o néctar, o doce em calda, o doce cristalizado e a geleia (MATSUURA et al., 2013). Dos frutos também são extraídos a papaína, uma enzima proteolítica de ampla utilização para os mais variados fins nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos.

O mamoeiro é uma planta herbácea, de ciclo semi-perene. A cultura possui grande importância social, uma vez que gera empregos e absorve mão de obra abundante durante todo o ano, visto que, os tratamentos culturais, a colheita e a comercialização são efetuadas de maneira contínua nas lavouras, além dos plantios serem renovados, em média, a cada dois ou três anos (SOUZA, 2013).

A Índia é a maior produtor mundial de mamão, com uma produção de mais de 5 milhões de toneladas e uma área colhida em torno de 130 mil hectares (FAO, 2014). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, com uma participação de 12,2% da produção mundial, correspondendo a mais de 1,5 milhões de toneladas; numa área de 31,9 mil hectares (FAO, 2012). Em nível regional, o Nordeste destaca-se como o maior produtor, englobando mais de 60% da produção nacional, com destaque para o Estado da Bahia com uma produção 718.726 toneladas. O Estado do Espírito Santo, representante da região Sudeste, apresenta a segunda maior produção com 404.720 toneladas de frutos (IBGE, 2014).

As cultivares de mamoeiro mais exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos: ‘Solo’ e ‘Formosa’. As cultivares do grupo ‘Solo’ possuem alto potencial de endogamia (autofecundação) e apresentam frutos de menor tamanho, com peso médio de 350 a 700 g, sendo destinados para o mercado interno e, principalmente, para o mercado externo. As principais cultivares do grupo ‘Formosa’ são híbridas importadas que produzem frutos de maior tamanho, com peso de mais de 1,0 kg, sendo, principalmente, destinados ao mercado interno (SERRANO; CAETANO, 2010).

Os frutos de mamão produzidos no Brasil apresentam qualidades excelentes, tais como, ótimo sabor e boa aparência, podendo ser produzido e exportado durante o ano todo. Essa regularidade de suprimento é uma das vantagens competitivas do fruto brasileiro com relação aos diversos países produtores (COSTA et al., 2010). A demanda interna pelos frutos é grande e há tendência de crescimento das exportações brasileiras de mamão com a inclusão de novas áreas dentro do conceito de ‘system approach’, produção integrada e produção orgânica (COSTA et al., 2010; SOUZA, 2013).

2.2 Problemas fitossanitários na cultura do mamão

Vários fatores podem limitar a produção de mamão, tais como, a ocorrência de insetos-praga e fitopatógenos causadores de doenças. Segundo Ventura et al. (2003), as doenças acarretam severas perdas econômicas na produção, comercialização e exportação de frutos *in natura*, podendo chegar, em alguns casos, a 100%. Dentre as doenças de importância, destacam-se o tombamento, a antracnose, a varíola, a podridão do pé e doenças causadas por vírus (SIMÃO, 1998; MEISSNER FILHO et al., 2013).

As doenças radiculares são caracterizadas por diversas sintomatologias nas plantas, incluindo podridões de sementes, tombamento de plântulas de pré e pós-emergência, podridões de raízes, murchas vasculares e podridões moles (MICHEREFF; ANDRADE; PERUCH, 2005).

O tombamento, também denominado “damping-off”, caracteriza-se pelo tombamento de plântulas, resultado da podridão de tecidos tenros da base do caulículo. Se a podridão ocorrer antes da emergência da planta, é denominado "tombamento de pré-emergência", se a ocorrência se der após a emergência da planta é denominado "tombamento de pós-emergência" (BEDENDO, 1995; AUER; GRIGOLETTI; SANTOS, 2001; CAMPOS, 2008).

Na fase de produção de mudas e no estabelecimento do plantio no campo, a podridão do colo e o tombamento são as doenças de maior importância, sendo os agentes causais habitantes do solo, e, dentre esses, se destacam os fitopatógenos do gênero *Rhizoctonia*,

Phytophthora, *Pythium* e *Fusarium* (BEDENDO, 1995; OLIVEIRA, 2000; MICHEREFF; ANDRADE; PERUCH, 2005; MEISSNER FILHO et al., 2013).

No mamoeiro, a podridão das raízes é considerada uma das principais doenças da cultura, ocasionando danos econômicos que variam grandemente de uma região para outra (LUZ et al., 2001). A sintomatologia de plantas de mamoeiro que apresentam “damping-off” são: encharcamento dos tecidos na região do colo; constrição da área afetada; e apodrecimento das raízes, com posterior tombamento das plantas, seguido de morte (OLIVEIRA, 2000).

2.3 O Patógeno *Pythium* sp.

O gênero *Pythium* foi descrito em 1958, por Pringsheim. As espécies desse gênero pertencem ao reino Chromista, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae, apresentando atualmente 262 espécies registradas (INDEX FUNGORUM, 2014). Algumas características que compreendem a classificação deste microrganismo neste Reino são: parede celular composta de celulose; micélio diplóide na maior parte do ciclo de vida; presença de centríolos; produção de esporos assexuais biflagelados tendo pelos em um dos flagelos, denominados zoósporos; e produção de esporos sexuais de parede espessa, chamados oósporos; distinguindo assim, estes, dos fungos verdadeiros, ou seja, os pertencentes ao reino Fungi (CORLISS, 1994; AGRIOS, 2005; HARDHAM, 2007).

De acordo com as características morfológicas do gênero *Pythium*, Van Der Plaats-Niterink (1981), realizou um dos mais completos estudos sobre as espécies desse gênero, descrevendo características morfológicas de 86 isolados diferentes, e propôs uma chave de identificação. A principal característica morfológica para identificação do gênero *Pythium* é a reprodução assexuada por meio de zoósporos biflagelados, onde a maturação e desenvolvimento dos zoósporos não ocorrem dentro do zoosporângio, e sim, no interior de uma vesícula evanescente formada no ápice do tubo de descarga do zoosporângio, o que os diferem das espécies do gênero *Phytophthora* (KUCHAREK; MITCHELL, 2000; LUZ et al., 2001; HARDHAM, 2007).

O patógeno pode produzir um micélio incolor, amarelado ou acinzentado, podendo, ainda este, ser aéreo, dependendo do meio de cultura no qual é cultivado (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981). O micélio pode ter coloração branca, de rápido crescimento, no qual são produzidos os esporângios responsáveis pela reprodução assexuada e oósporos ornamentados (AGRIOS, 2005; BARRETO; REZENDE; BLUM, 2011). As espécies do gênero *Pythium* destacam-se, principalmente, pela patogenicidade de muitas espécies em plantas de interesse econômico. Trata-se de um importante agente causador da podridão de sementes, tombamento

de mudas e podridão de raízes, podendo ainda causar podridões de frutos carnosos em contato com o solo (AGRIOS, 2004). No sistema hidropônico de diversas culturas, como pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* L.), a podridão radicular apresenta uma grande ameaça à produtividade (SUTTON et al, 2006).

Na cultura do mamoeiro, espécies de *Pythium* têm sido notificadas como o agente causador da podridão do colo em diversos países. Em 1993, Oluma e Oladiran, notificaram a doença na Nigéria; Alvarado (2001) comunicou a doença no México; e Koffi et al. (2010), confirmaram a doença na Costa do Marfim. No Brasil, o complexo podridão do colo ou tombamento do mamoeiro vem sendo bastante estudado. Embora a doença possa ser causada por *Pythium* sp., *Fusarium* e *Rhizoctonia solani*, comumente a espécie *Phytophthora palmivora* é diagnosticada como sendo o principal agente causal. No entanto, *Pythium* sp. já foi notificada nos estados do Ceará e Pará como sendo agente etiológico responsável pelo podridão do colo, estiolamento e tombamento de mudas de mamão (RITZINGER; SOUZA, 2000; BARRETO; SANTOS, 2002; COSTA et al.,2007).

2.4 Caracterização molecular

Avanços de técnicas moleculares têm sido de grande importância para diagnósticos, identificação e estudos filogenéticos de oomicetos, dentre esses, as espécies do gênero *Phytophthora* e *Pythium*.

Estudos tem relatado que a região DNA a ser utilizada para a identificação dos oomicetos ao nível de espécie é o espaço interno transcrito (ITS) da região de rDNA (ROBIDEAU et al., 2011). A região ITS em oomicetos é facilmente amplificada por sequenciamento do DNA na maioria das espécies com o uso de PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo o sequenciamento dessa região muito utilizado na detecção de novas espécies de *Pythium* (PAUL ,2001).

Wang; Wang; White (2003), destacaram sucesso na identificação de espécies de *Pythium* usando amplificação por PCR. Os autores ainda destacaram o método como eficaz na identificação de espécies de *Pythium* devido à sua facilidade e rapidez dos resultados.

A filogenia molecular de espécies do gênero *Pythium*, baseada em suas sequências e taxonomia, está dividida em 11 clados do A ao K (LEVESQUE; DE COCK, 2004). No clado K encontram-se sete espécies diferenciadas, cujas sequências parecem estar mais próximas das

espécies do gênero *Phytophthora*. Entretanto, foi proposto que estas espécies pertençam a um novo gênero denominado *Phytopythium* (De COCK et al., 2012).

Ao estudar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Pythium*, com base nas sequências de diferentes regiões, ITS1 e ITS2 do rDNA, gene β -tubulina e gene do citocromo *c* oxidase subunidade II (COX II), Villa et al. (2006), revelaram clados com referência nas características da morfologia dos esporângios e destacou sua importância para a taxonomia das espécies de *Pythium*.

Robideau et al. (2011), utilizando iniciadores específicos para oomicetos, para sequenciar a região citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), concluíram que o COI, em alguns casos de maior dificuldade na conceituação de espécies de *Phytophthora* e *Pythium*, proporcionou melhor resultado.

2.5 Controle da doença

Vários fatores podem contribuir para a ocorrência do tombamento de plantas, uma vez que os patógenos causadores da doença são habitantes de solo. Dentre esses fatores destacam-se: o cultivo em solos mal drenados, a presença do inóculo no substrato, o adensamento entre as plantas, alto índice pluviométrico, entre outros.

Agrios (2005), destaca que as doenças causadas por *Pythium* spp., podem ser controladas mediante a utilização de solo esterilizado ou pasteurizado pelo vapor ou por calor seco e através do uso de tratamento químico da semente.

Entretanto, o controle do tombamento de plântulas é realizado tradicionalmente com a utilização de fungicidas e a desinfestação química do substrato. Para os oomicetos *Pythium* e *Phytophthora*, o produto químico Fosetyl-Al, no tratamento de solo e via foliar, e o Metalaxyl, no tratamento de sementes, são os mais recomendados pela eficiência apresentada. Por outro lado, o surgimento da resistência do patógeno é uma das desvantagens da utilização desses fungicidas (MICHEREFF; ANDRADE; PERUCH, 2005). De uma maneira geral, custos elevados da prática do controle químico, associado ao surgimento de resistência aos produtos comumente empregados, bem como a proibição do uso de outros, como o brometo de metila, torna essencial o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle.

2.5.1 Controle alternativo com óleos essenciais e extratos vegetais

Pesquisas recentes têm mostrado que produtos naturais, como os extratos vegetais e os óleos essenciais, apresentam ação fungitóxica, despertando grande interesse científico no emprego do controle alternativo de fitopatógenos. A ação fungitóxica pode ser decorrente da

atividade antimicrobiana exercida diretamente contra o patógeno, retardando o crescimento micelial ou inibindo a esporulação e a germinação de esporos (VENTUROSOSO et al., 2011; GARCIA et al., 2012)

Morandi e Bettioli (2009) destacaram que os vegetais são fontes inesgotáveis de moléculas, muitas ainda desconhecidas, que podem servir de modelo para síntese química, gerando produtos de baixo custo, eficazes, ambientalmente seguros, que atendam as necessidades de produtores. Sendo assim, o controle de doenças de plantas, baseados na utilização de substâncias naturais provenientes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, muitas vezes de fácil obtenção, baixo custo que não tenham toxidez residual, podem ser uma alternativa segura para o controle de doenças de plantas (MORAIS, 2009).

Segundo Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados desde a Idade Média para fins bactericidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, aplicações medicinais e cosméticos. Os óleos essenciais são compostos naturais, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, caracterizada por possuírem um odor agradável e forte, produzidos por plantas aromáticas com metabólitos secundários (STANGARLIN et al., 1999; BAKKALI et al., 2008; MORAIS, 2009; SCHERER et al., 2009).

De acordo com Bakkali et al. (2008), as propriedades biológicas dos óleos essenciais devem ser consideradas, uma vez que trata-se de misturas complexas de muitas moléculas, pois, os efeitos biológicos podem ser resultado de um sinergismo de todas as moléculas ou de compostos majoritários.

Vários óleos essenciais extraídos de diferentes espécies vegetais vêm mostrando a eficiência no controle de fitopatógenos, tanto na ação antimicrobiana como indutora de resistência (KNAAK; FIUZA, 2010; PEREIRA et al., 2012; MAIA et al., 2014).

Pesquisas têm evidenciado com sucesso o uso do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) no controle de fitopatógenos (PIATI; SCHNEIDER; NOZAKI, 2011; SOUZA; SERRA; MELO, 2012). Os óleos essenciais isolados do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Myrtaceae, possuem aromas característicos de acordo com a espécie. São classificados em três tipos, em função da sua composição e utilização final, como, medicinal, de perfumaria e industrial. Dentre estes, o mais importante em termos de mercado é o medicinal, caracterizado pelo elevado teor em 1,8-cineole também chamado de eucaliptol (FIGUEIREDO et al., 2013). A espécie *Eucalyptus globulus* é a referência da Farmacopeia Portuguesa, obtido por destilação das folhas ou ramos terminais jovens. Segundo Figueiredo et al., (2013), a norma nacional quanto ao teor mínimo de 1,8-cineole é semelhante às internacionais, com determinação do teor mínimo de cerca de 70% no óleo essencial.

Outro óleo essencial que vem sendo estudado é o extraído do capim citronela (*Cymbopogon nardus* L.), planta originária da Índia, pertencente à família Poaceae, com propriedades calmantes e digestivas e que apresenta atividade repelente, ação bactericida e fungicida (MENEZES, 2005). A composição química do óleo essencial de citronela apresenta como compostos majoritários citronelal, geraniol e citronelol. A produção desses metabólitos secundários podem variar com as relações ecológicas e genéticas da planta. (CASTRO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; OOTANI et al., 2013).

O óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), pertencente à família Lamiaceae e muito conhecida por possuir ação medicinal, também vem sendo utilizado com êxito no controle de fungos fitopatogênicos (FREIRE, 2006). A composição química do seu óleo essencial é muito importante para a indústria farmacêutica, de cosmético e de alimentos (SOUZA et al., 2006).

Segundo Freire (2006), análises cromatográficas permitiram a identificação de 57 compostos no óleo essencial de *M. piperita*, sendo o mentol identificado como o componente majoritário do óleo. Conforme Haber et al. (2005), o mentol apresenta propriedades antiespasmódica, antiinflamatória, antiúlcera e antiviral.

Com relação aos extratos vegetais, Diniz et al. (2006), ressalva que esses podem conter moléculas complexas na sua composição, como, compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides, que são sintetizados pelo metabolismo secundários das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas entre as próprias plantas, plantas e animais e plantas e microrganismos fitopatogênicos.

De acordo com a definição estabelecida pela ANVISA (2009), os extratos vegetais são preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, e podem ser preparados por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando frequentemente como solvente, o etanol ou a água.

Extratos aquosos de diversas espécies vegetais são eficientes no controle de fungos fitopatogênicos. Dentre esses, o extrato de alho (*Allium sativum* L.) encontra-se entre os mais pesquisados e o seu efeito inibitório tem sido demonstrado para uma extensa gama de fungos, envolvendo não só patógenos de pós-colheita, mas também patógenos foliares e de solo (SEALY; EVANS; ROTHROCK, 2007; LEITE et al., 2011; LEITE et al., 2012; PERELLÓ; NOLL; SLUSARENKO, 2013).

O alho tem como principal componente a alicina, que é responsável pelo odor característico do alho, sendo a substância ativa produzida quando o alho é danificado, isto é, quando é cortado ou triturado (MENDES, 2008).

Para os oomicetos, Sealy; Evans; Rothrock (2007), observaram a capacidade fungicida do extrato de alho nas espécies *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *Phytophthora cinnomomi* e *P. nicotianae*.

Outro extrato vegetal que tem se destacado com relação ao controle de pragas e doenças de plantas é o da *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). Trata-se de uma planta conhecida popularmente como nim, originária da Índia e que possui como princípio ativo a azadiractina, componente de amplo espectro de ação derivado de diferentes partes da planta. A azadiractina é um complexo tetranortriterpenoide, limonoide, encontrado principalmente nas sementes, e devido à sua complexidade, até o momento, não foi sintetizado. O nim é a espécie botânica mais estudada para fins agrônômicos e destaca-se por sua alta eficiência e baixíssima toxicidade (MENEZES, 2005).

O óleo emulsionável de nim é amplamente comercializado, e seu modo de ação no controle de fitopatógenos tem sido investigado por alguns pesquisadores (NEVES; OLIVEIRA; MOHN, 2003; CARNEIRO, 2003; PIGNONI; CARNEIRO, 2005). Dinis et al. (2006), destacou o óleo de nim como produto alternativo promissor para o controle da requeima do tomateiro (*S. lycopersicum* L.).

Segundo Dias-Arieira et al. (2010), o óleo de nim reduziu o abortamento floral e a ocorrência de frutos de morangueiro (*Fragaria vesca* L.) doentes, advindos de flores inoculadas com *Colletotrichum acutatum*. Carneiro et al. (2007), observaram que o óleo de nim foi eficiente no controle do oídio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). De acordo com Medice et al. (2007), o efeito fungistático ou inibitório do óleo de nim, provavelmente se deve à presença da azadiractina, substância bioativa de alto poder biológico.

2.6 Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa, inativos ou latentes, e quando estes são acionados ou ativados são, por sua vez, expressos. De acordo com Agrios (2005), a indução de resistência de plantas consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte destas, fazendo com que ela própria se defenda contra o ataque de patógenos.

Segundo Barros (2013), a defesa vegetal contra fitopatógenos são alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário das plantas.

A resistência induzida pode ativar mecanismos estruturais, de lignificação, formação de papilas, ou respostas bioquímicas, como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a patogênese do tipo β -1-3-glucanases e quitinases (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A atividade enzimática tem efeitos expressivos na resistência à infecção, com redução significativa do ataque de patógenos. Indutores de resistência bióticos e abióticos são utilizados na defesa de plantas a patógeno, e acréscimos nas atividades das enzimas Peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (FAL) têm sido demonstrados durante o processo de indução de resistência (CAMPOS et al., 2004; RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006; SILVA, 2007; ALAMINO et al., 2013).

A POX é uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis e defesa de patógenos (CAMPOS et al., 2004). A enzima atua na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na oxidação de fenóis, na síntese de compostos fenólicos tóxicos aos fungos, e na síntese de lignina (CAMPOS et al., 2004).

A FAL é uma enzima importante envolvida no mecanismo de defesa da planta ao ataque de patógenos, sendo responsável pela conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é um intermediário importante para produção de diversos fenilpropanoides, tais como, a lignina, os flavonoides e o ácido salicílico. Essa enzima já foi isolada de algas, fungos e, principalmente, de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (STANGARLIN et al., 2011).

A indução de resistência com indutores abióticos como o Acibenzolar-S-metil (ASM) vem sendo largamente utilizado em diversos patossistemas, apresentando amplo espectro de ação contra fungos, vírus e bactérias. Trata-se de um potente ativador de defesa de plantas, entretanto, não possui ação direta contra patógenos. Ao ser aplicado na parte aérea das plantas, o ASM ativa os seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumenta sua resistência às doenças. O Produto é registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 005801; é comercializado como Bion® (Syngenta, Basel, Suíça) e indicado para o Manejo Integrado de Doenças (MID). Diversos pesquisadores já comprovaram a ação do ASM na indução de resistência a doenças fúngicas de plantas (SILVA, 2007; ARAUJO; MENEZES, 2009).

Dentre os indutores mais utilizados, além do ASM, destacam-se o ácido β -aminobutírico (BABA) e quitosana (JAKAB et al., 2001). Provavelmente, o BABA induz a produção de proteínas PR, como ocorre com o ASM. Andreu et al. (2006) observaram uma diminuição significativa na infecção causada por *Phytophthora infestans* em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) quando tratadas com BABA.

Contudo, extratos vegetais e óleos essenciais derivados de plantas medicinais vêm sendo curiosamente estudados a fim de serem utilizados como indutores de resistência efetivos em diversos patossistemas.

Uma referência de produto obtido de extratos vegetais na indução de resistência de plantas contra patógenos é produto comercial Ecolife®. Trata-se de um extrato adquirido de biomassa cítrica, registrado como fertilizante junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e que possui selo de certificação orgânica, composto por bioflavonoides cítricos, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (CAVALCANTI al., 2006; FURTADO et al., 2010).

O produto possui ação sinérgica entre seus componentes, agem regulando o vigor vegetativo, ocasionando um melhor direcionamento energético para necessidades reprodutivas das plantas. De acordo com Furtado et al. (2010), o Ecolife® pode atuar por indução de resistência ou por ação direta contra os fitopatógenos. Cavalcanti et al. (2006), evidenciou a ação do produto contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomateiro, com aumento da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas.

Resende et al. (2007), utilizando extrato de lobeira (*Solanum lycocarpum*) na indução de resistência em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) contra a vassoura-de-bruxa, observaram ativação de respostas de defesa das plantas. Segundo Stangarlin et al. (2011), extrato aquoso de *Eucalipto citriodora* foi capaz de induzir resistência local em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*.

De acordo com Vergnes et al. (2014), estudo realizado com o óleo essencial de gualteria (*Gaultheria procumbens*) mostrou que o óleo possui a mesma eficácia que o produto comercial BION® na resistência contra *Colletotrichum higginsianum* testado em *Arabidopsis*. Itako; Tolentino Júnior; Schwan-Estrada (2013), observaram que o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon citratus*), aplicado em plantas de tomate, mostrou ação direta sobre *Alternaria solani* e induziu mecanismos de resistência local e sistêmica. Segundo Maia et al. (2014), o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) induziu a resistência em videira contra o míldio e a mancha das folhas.

Dessa maneira, o desenvolvimento de uma agricultura que colabore com o meio ambiente, induz a busca de estratégias alternativas de controle, destacando-se o uso de compostos naturais capazes de estimular o sistema imune das plantas.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 922 p.

ALAMINO, D. A. et al. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.3, p. 249-254, 2013.

ALVARADO, G. R. et al. *Pythium aphanidermatum* Causing Collar Rot on Papaya in Baja California Sur, Mexico. **Plant Disease**, v. 85, n.4, p. 444.3, 2001.

ANDREU A. et al. Enhancement of the disease resistance of potato by chemicals. **Pest Management Science**, v.62, 162--170. doi: 10.1002/ps.1142
AshwellG(1957)Colorimetricanalysisofsugars.MethodsinEnzymology3, 73--105.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 63, de 23 de setembro de 2009. D.O.U de 24/09/09 . Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 de maio de 2014.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p. 169-172, 2009.

AUER, C. G.; GRIGOLETTI Jr., A.; SANTOS, A. F. Doenças em pinus: identificação e controle Colombo: **Circular Técnica - EMBRAPA**, 2001. 28p.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARRETO, P.D.; SANTOS, A. A. CMF 056 - Genótipo de Mamoeiro com Potencial para Cultivo no Ceará, **Comunicado Técnico - EMBRAPA**, Fortaleza, CE. 2002.

BARRETO, S. da S.; REZENDE, D. V. de; BLUM, L. E. B. Fungos em sementes de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n.3, p. 561-573, 2011.

BARROS, P. N. **Potencial dos extratos de plantas da caatinga para atividade antifúngica e indutora de resistência**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, AL, 2013.

BEDENDO, I. P. Damping off. In: Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 3. ed, p.820-828,1995.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p. 637-643, 2004.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. **Comunicado Técnico** - EMBRAPA, Pelotas, RS. 2002.

CAMPOS, S. C. **Tratamento químico de sementes de mamoeiro para o Controle do tombamento causado por *Rhizoctonia solani***. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

CARNAÚBA, J. P., et al. *Phytophthora palmivora*, agente da podridão de raiz e frutos de mamoeiro no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 2006.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CARNEIRO, S.M.T.P.G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.29, n. 3, p. 262-265, 2003.

CASTRO, H. G. et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CAVALCANTI, F.R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, v. 39, p. 408-417, 2006.

CORLISS, J. An interim utilitarian ('User-friendly') hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**, v. 33, p. 1-51, 1994.

COSTA, F. B. et al. Armazenamento refrigerado do mamão Havaí 'Golden' produzido na Chapada do Apodi-RN Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, n. 4, v.. 5, p. 37-54, 2010.

COSTA, R. C. et al. Ocorrência de *Pythium* sp. em mamoeiro no Estado do Pará. In: **Jornada de Iniciação Científica do Pet, 2.**, PA. 2007.

DANTAS, J. L. L. et al. Variedades e Características da Planta. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde. 2. Ed.** Brasília, DF. Embrapa, p. 16-28, 2013.

DIANESE, A.C., BLUM, L.E.B., DUTRA, J.B., LOPES, L.F., SENA, M.C., FREITAS, L.F. & YAMANISHI, O.K. Reação de genótipos de mamoeiro à varíola e à podridão-do-pé. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 p.419-423. 2007.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p. 228-232, 2010.

DINIZ, L. P. et al. Avaliação de Produtos Alternativos para Controle da Requeima do Tomateiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, vol.31, n.2, p. 171-179, 2006.

FAO. Produção Mundial de mamão de 2012 . Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/. Atualizado em 07/02/2014. Acesso em 15/04/2014.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*. **Tecnologia Agroalimentar**, 2013.

FREIRE, M. M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

FURTADO, L. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.1,p.48-57, 2012.

HABER, L. L. et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha piperita* e *Melissa officinalis*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p. 1006-1009, 2005.

HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycet interactions. **Celular microbiology, Oxford**, v.9 p.31-39, 2007.

IBGE. Produção Agrícola Municipal de 2013. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/. Acesso em 10/06/2015.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=20465>. Acesso em: 30/04/2014.

ITAKO, A.T.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. **IDESIA**,v 31, n 4, p.11-17, 2013.

JAKAB G, et al. b-aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology** v.107, p.29 -37,2001.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KOFFI, C. N. B. et al. *Occurrence of Pythium aphanidermatum* Root and Collar Rot of Papaya (*Carica papaya* L.) in Côte d'Ivoire. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, p.62-67, 2010.

KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. **Plant Pathology Fact Sheet**, p. 53, 2000.

LEITE, C. D. et al. Extrato de alho e óleo vegetal no controle do míldio da videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.2, p. 429-436, 2011.

LEITE, C.D. et al. Extrato de alho no controle *in vitro* e *in vivo* da antracnose da videira. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.3, p. 556-562, 2012.

LUZ, E. D. M. N. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil Livraria e Editora Rural – LTDA, p. 413, 2001.

MAIA, Aline José et al. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.5, p. 330-339, 2014.

MEISSNER FILHO, P. E. et al. Doenças. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão** - O produtor pergunta, a Embrapa responde. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, p. 95-120, 2013.

MENDES, P. A.P. **Estudo do Teor de Alicina em Alho**. 2008. 35 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança, Bragança, SP, 2008.

MENEZES, E. L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2005, 58 p.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, UFRPE, 398p, 2005.

MORAIS, L.A.S. Influencia dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 7-14, 2009.

MATSUURA et al. Formas de Processamento. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão** - O produtor pergunta, a Embrapa responde. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, p. 51-63, 2013.

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

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; MOHN, J. C. Cultivo e utilização do nim indiano. Santo Antônio de Goiás: **Circular Técnica - EMBRAPA**, p. 2, 2003.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO, H. P. Doenças do mamoeiro. In: SOUZA, J. da S.; RITZINGER, C. H. S. P. Mamão Fitossanidade. **Comunicação para Transferência de Tecnologia** - EMBRAPA, Brasília, v.11, p.37-46, 2000.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Propagação e Produção de Mudas. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão** - O produtor pergunta, a Embrapa responde. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 51-63, 2013.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OLUMA, H.; OLADIRAN, A. *Pythium aphanidermatum* root rot of papaw (*Carica papaya* L.) in Nigeria. **Mycopathologia**123, p.111-115, 1993.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, N.2: p. 162-174, 2013.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Ceres. v.1, p.417-453, 1995.

PAUL, B. ITS region of the rDNA of *Pythium longandrum*, a new species; its taxonomy and its comparison with related species. **FEMS Microbiology Letters**, 202: 239–242, 2001.

PEREIRA, R. B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia**, n.4, v.36, p. 383-390, 2012.

PERELLÓ, A.; NOLL, U.; SLUSARENKO, A. J. In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 24, p. 1809-1817, 2013.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

PIGNONI, E.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Severidade da antracnose em feijoeiro e pinta preta em tomateiro sob diferentes concentrações de óleo de nim em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 68-72, 2005.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de Extratos Vegetais para Indução de Resistência e Ativação de Respostas de Defesa em Cacaueiro contra a Vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.3, p. 213-221, 2007.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Mamão fitossanidade. **Comunicação para Transferência de Tecnologia - EMBRAPA**, Brasília, 2000. 91 p.

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S.B. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, p. 492-499, 2006.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.11, n.4, p. 442-449, 2009.

SEALY, R.; EVANS, M.R.; ROTHROCK, C. The Effect of a Garlic Extract and Root Substrate on Soilborne Fungal Pathogens. **Horttchnology**, 2007.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.3, 2010.

SILVA, A. C. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1853-1860, 2009.

SILVA, E. K. .C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: um enfoque agroecológico. **Revista Educamazônia - Educação Sociedade e Meio Ambiente**, v.10, n 1, p. 143-157, 2013.

SILVA, J. C. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal do Panamá da bananeira**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, AL, 2007.

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

SOUSA, R. M.S.; SERRA, I. M. R. S.; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

SOUZA, J. S. Comercialização, Aspectos Econômicos e Custos de Produção. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, 2013, p. 95-120.

STADNIK M.J.; TALAMINI V. Manejo Ecológico de Doenças de Plantas. CCA-UFSC: Florianópolis, cap. 3, p.45-62-293, 2004.

STANGARLIN, J.R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, V. 10, n 1, p. 18-46, 2011.

STANGARLIN, J. R. et al. Control of Plant Diseases using Extracts from Medicinal Plants and Fungi. In: Méndez-Vilas A. (ed.) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex, p.1033-1042, 2011.

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

SUTTON, J.C., et al. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, v 32, p. 307-321, 2006.

VAN DER PLAATS-NITERINK A.J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, n. 21, 242 p. 1981.

VENTURA J.A. et al. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia. In: Martins D. dos S. (ed). Papaya Brasil: Qualidade do Mamão para o Mercado Interno, INCAPER, p. 267-276, 2003.

VENTUROSOSO, L.M.A. et al. Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais, **Arquivos Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.89-95, 2011.

VERGNES, S. et al. Foliar treatments with *Gaultheria procumbens* essential oil induce defence responses and resistance against a fungal pathogen in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, 2014.

WANG, P.H.; Wang, Y.T.; White, J. G. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, 127-32, 2003.

3 ESTUDO DA PODRIDÃO DO COLO E DAS RAÍZES DO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.): CARACTERIZAÇÃO DE *Pythium cucurbitacearum*

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar a espécie de *Pythium*, causadora da podridão das raízes e do colo do mamoeiro, coletado no município de Coruripe, a partir da caracterização morfofisiológica e molecular. O isolado de *Pythium* sp. foi obtido de material vegetal com sintomas de podridão de colo e apodrecimento de raízes. Posteriormente, o patógeno foi identificado e caracterizado molecularmente através do sequenciamento da região Citocromo Oxidase subunidade I (Cox1) e análise filogenética. A caracterização morfológica foi realizada através de medições de cada tipo de estrutura produzida. Em seguida avaliou-se a patogenicidade em frutos e plantas de mamão (*Carica papaya* L.); a virulência em diferentes hospedeiros, frutos de: melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.), e em frutos de mamoeiro da variedade 'Golden'. A incidência da doença foi determinada em uma área de cultivo de mamoeiro situada no município de Coruripe-AL. Foi realizado um ensaio objetivando caracterizar morfológicamente, o patógeno em diferentes meios de cultura. O estudo filogenético baseado na região Cox1 do DNA construído usando o método de "maximum Likelihood Tree" com base em 1000 réplicas de "bootstrap", mostrou 100% de similaridade genética com a espécie *Pythium cucurbitacearum*. O isolado apresentou as seguintes características morfológicas: esporângios globosos, não papilados, com diâmetro variando de 11,04 – 21,01 μm (média = 16,20 μm); oósporos apleróticos, esféricos, 12,17 – 19,49 μm de diâmetro (média = 14,77 μm); parede lisa e dupla com 1,64 μm de espessura; oogônio esférico com 12,24 – 18,88 μm de diâmetro (média = 16,04 μm); anterídios presentes, sendo encontrado 1 por oogônio. O levantamento realizado em campo revelou incidência de 20,2% de tombamento causado pela espécie de *Pythium* estudada. O isolado mostrou-se patogênico não só aos frutos de mamão, mas também aos frutos de melão, pepino, tomate e tubérculos batata. Os diferentes meios de cultura testados não mostraram diferenças com relação ao desenvolvimento do patógeno.

Palavras-chave: Mamão. Tombamento. Cox1. Virulência.

**STUDY OF STEM ROT AND ROOTS OF PAPAYA (*Carica papaya* L.):
CHARACTERIZATION OF *Pythium cucurbitacearum*.**

ABSTRACT

This study was conducted with the objective to identify the species of *Pythium*, causal agent of stem rot and in roots of papaya, collected in the municipality of Coruripe, from the Morphophysiological and molecular characterization. The isolated from *Pythium* sp. It was obtained from plant material with symptoms of collar rot and root rot. Subsequently, the pathogen has been identified and molecularly characterized by sequencing of Cytochrome Oxidase subunit I region (COX1) and phylogenetic analysis. The morphological characterization was performed through measurements of each type of structure produced. Then the pathogenicity was evaluated in fruits and papaya plant (*Carica papaya* L.); virulence in different host, fruit: melon (*Cucumis melo* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and potato tubers (*Solanum tuberosum* L.), and papaya fruit of the variety 'Golden'. The incidence of the disease was determined in a papaya growing area in the municipality of Coruripe, AL. We conducted a test in order to characterize morphologically, the pathogen in different culture media. The phylogenetic analysis based on DNA COX1 region constructed using the "method" maximum likelihood tree "based on 1000 replicates the "bootstrap", showed 100% genetic similarity to the species *Pythium cucurbitacearum*. The isolate showed the following morphological characteristics: globose sporangia, not papillate, with diameters ranging from 11.04 to 21.01 μm (mean = 16.20 μm); oospores apleróticos, spherical, from 12.17 to 19.49 μm in diameter (mean = 14.77 μm); smooth wall and double with 1.64 μm thick; oogônio spherical with 12.24 to 18.88 μm in diameter (mean = 16.04 μm); antheridia present, being found one by oogônio. The survey conducted in the field revealed an incidence of 20.2% of damping-off caused by *Pythium* species studied. The isolate was shown to be pathogenic not only the papaya fruits, but too the fruits of melon, cucumber, tomato and potato tubers. The different tested media showed no differences with relation in the development of the pathogen. The phylogenetic analysis based on the region Cox1 of DNA constructed using the method of 'maximum likelihood tree' based on 1000 replicates the "bootstrap" showed 100% genetic similarity to the specie *Pythium cucurbitacearum*.

Keywords: *Carica papaya*. Damping-off. Cox1. Virulence.

3.1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), pertencente à família Caricaceae, é considerada uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Além da grande aceitação de seus frutos sob a forma ‘in natura’, o mamoeiro também tem sido utilizado na produção de derivados na indústria de alimentos; apresenta ainda importância social gerando empregos, devido à grande absorção de mão de obra (DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013).

A cultura apresenta alguns problemas fitossanitários, como a podridão do colo e raízes, que é uma doença que pode ser encontrada em todas as áreas produtoras de mamão do mundo (OLIVEIRA, 2000). A doença pode ser causada por oomicetos, tais como *Phytophthora palmivora* e *Pythium* sp., podendo levar a perdas consideráveis, normalmente plantas jovens ainda no viveiro (MEISSNER FILHO et al., 2013).

Espécies do gênero *Pythium* têm sido notificadas como o agente causador da podridão do colo em mamoeiro em alguns países, assim como, a espécie *Pythium aphanidermatum* notificada no México (ALVARADO, 2001), Costa do marfim (KOFFI et al., 2010) e Nigéria (OLUMA; OLADIRAN, 1993). No Brasil, *Pythium* sp., já foi notificado em mamoeiro nos estados do Ceará e Pará como sendo agente etiológico responsável pelo podridão do colo, estiolamento e tombamento de mudas de mamão (RITZINGER; SOUZA, 2000; BARRETO; SANTOS, 2002; COSTA et al., 2007).

A caracterização taxonômica para as espécies de *Pythium* está fundamentalmente baseada em características morfológicas, tais como, o tamanho e tipo dos esporângios; forma, ausência ou presença de clamidósporo; forma, tamanho e posição de oogônio; e tamanho de oósporos (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981).

Considerando que a descrição de espécies é um processo exigente, envolvendo estudo morfológico detalhado, é de grande valia a utilização de técnicas moleculares para confirmar a identificação e classificação de patógenos. Desse modo, através de sequenciamento de regiões conservadas, como as que estão presentes nos nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS) dos genes ribossomais (rDNA), vem sendo empregado com sucesso na análise filogenética de oomicetos dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora* (WANG; WANG; WHITE, 2003; LEVESQUE; DE COCK, 2004; ROSA et al., 2006).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo identificar o agente causador da podridão do colo e das raízes do mamoeiro, através de estudos morfofisiológico e molecular, e determinar a incidência da doença no estado de Alagoas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação, do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em Rio Largo-AL (9° 27'57" de latitude Sul, 34° 50'1" de longitude Oeste e 127 m de altitude).

3.2.2 Isolamento do patógeno e incidência da doença em campo

O isolado de *Pythium* sp., utilizado no experimento foi obtido a partir de material vegetal de mamoeiro com sintomas de podridão de colo, proveniente de uma propriedade produtora de mamão, situada no município de Coruripe Estado de Alagoas a 10°07'32" de latitude Sul, 36°10'32" de longitude Oeste e 16 m de altitude, em maio de 2012. O isolamento do patógeno foi realizado a partir de fragmentos de caule apresentando sintomas da doença.

A incidência da podridão radicular no campo foi determinada com base no número total de plantas e no número de plantas com sintoma de tombamento. Sintomas secundários da doença não foram contabilizados no momento da avaliação, pela impossibilidade de coleta de material, e também pela possibilidade de poder tratar-se de outra agente patogênico. Foram realizadas duas contagens de 100 plantas, em três áreas diferentes, totalizando 600 plantas. A contagem foi realizada nas fileiras de plantio de maneira aleatória. Avaliou-se as plantas que apresentavam-se tombadas devido a podridão radicular (Figura 1). Amostras de material com sintomas foram coletadas, acondicionadas em sacos plástico e levadas ao laboratório para posterior identificação.

Os tecidos da margem da lesão foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 0,1% (produto comercial com 2%) por dois minutos, lavados em água estéril e colocados para secar em papel de filtro esterilizado. Após desinfestação, fragmentos do caule (5 mm de comprimento) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata – 200 g, Ágar – 18 g, Dextrose – 20 g e água destilada – 1000 mL), e incubados em BOD à temperatura de 25°C. Após sete dias, verificou-se o crescimento da colônia. Posteriormente, o patógeno foi preservado em BDA em temperatura ambiente.

Figura 1 – Área implantada com mamoeiro, com algumas plantas tombadas (A); Planta de mamão tombada (B); Sistema radicular com sintoma típico de podridão (C).



Foto: Autora (2014).

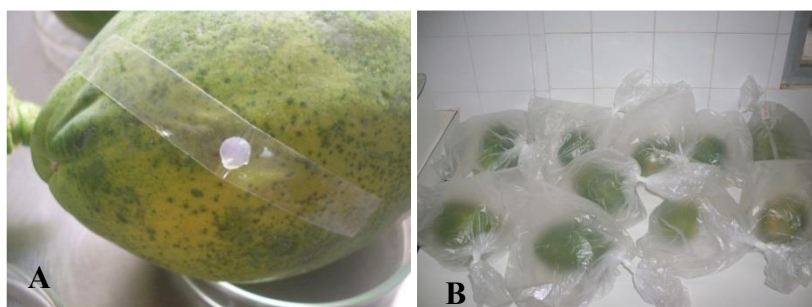
3.2.3 Identificação do isolado e caracterização morfológica

O isolado de *Pythium* sp. foi repicado para placas contendo meio V8 (200 mL de suco V8, 3 g de CaCO_3 , 17 g de ágar e 800 mL de água destilada). Após sete dias, foram feitas observações em lâminas para identificar as estruturas do patógeno. As medições das estruturas propagativas foram realizadas através de imagens capturadas por câmera digital (Olympus® IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). Foram efetuadas 50 medições de cada tipo de estrutura produzida.

3.2.4 Teste de patogenicidade e reisolamento de *Pythium cucurbitacearum*

A patogenicidade foi realizada em frutos de mamão e em plantas da variedade Golden com 45 dias após a germinação. Para os frutos, foram utilizados 10 frutos sadios no estágio 2 de maturação. Os frutos foram lavados com água e sabão, sendo em seguida, imersos em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante 20 minutos, secos em condições ambientais e postos em bandejas plásticas. A inoculação foi realizada mediante a inserção de um disco do meio de cultura contendo micélios de *Pythium* sp., em ferimentos provocados nos frutos, provocado com o auxílio de alça flambada (Figura 2). Nos frutos testemunha, utilizaram-se discos contendo apenas meio de cultura BDA. Os frutos foram colocados em câmara úmida por 48 h.

Figura 2 – Inoculação de *Pythium cucurbitacearum* em frutos de mamão. Fruto inoculado com isolado do patógeno (A); frutos inoculados mantidos em câmara úmida (B).



Fonte: Autora, 2014.

A patogenicidade em plantas foi realizada utilizando dois diferentes métodos de inoculação: o método de deposição de disco de inoculo e método de dipping.

O primeiro método foi realizado para confirmar os sintomas de podridão de colo, através da inoculação de 10 plantas com 45 dias de idade, cujas sementes foram obtidas de frutos sadios de mamão da variedade Golden, plantadas em copos descartáveis de 400 mL contendo o substrato comercial Bioplant® esterilizado. Com o auxílio de uma alça esterilizada faz-se ferimento no colo das plantas e sobre o ferimento depositou-se disco de BDA contendo micelio do isolado do patógeno. Posteriormente, os copos foram colocados em placas de Petri contendo água e um chumaço de algodão umedecido com ADE úmido por 48 h, a fim de manter a umidade (Figura 3).

Figura 3 – Mudanças de mamão com 45 dias de idade (A); ferimento no caule (B); inoculação de disco de BDA contendo micélio de *Pythium cucurbitacearum* (C); Copos em placas de Petri com água e um chumaço de algodão úmido (D).



Fonte: Autora, 2014.

Para avaliar os sintomas de podridão de raiz, as mudas foram desenvolvidas em tubetes, com capacidade para 288 cm³, contendo Biopant® esterilizado e autoclavado, as plantas com 45 dias de idade foram retiradas dos tubetes e o sistema radicular foi imerso em uma suspensão homogênea em liquidificador composta por micélio, numa proporção de uma placa de Petri em 200 mL de ADE, por 20 minutos. Posteriormente, as plantas foram transplantadas em copos descartáveis com capacidade de 400 mL (Figura 4), os copos foram colocados em bandejas com aproximadamente 2cm de nível de água, onde permaneceu por 48 h.

Os frutos e as plantas que apresentaram sintomas típicos da doença foram utilizadas para o reisolamento do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA, sob condições de ambiente.

Figura 4 – Mudanças de mamoeiro aos 45 dias de idade. Sistema radicular imerso em uma suspensão homogênea em liquidificador composta por micélio em 200 mL de ADE (A); transplante das mudas inoculadas para vasos de 400 mL (B); plantas inoculadas replantadas (C).



Fonte: Autora, 2014.

3.2.5 Patogenicidade de *Pythium* sp. em diferentes hospedeiros

Frutos sadios de melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) foram desinfestados, lavados com água corrente e sabão, tratados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 5 min. lavados por duas vezes em ADE e secos sobre papel toalha em temperatura ambiente. Posteriormente, os frutos receberam ferimento e foram inoculados com discos de meio de cultura (6 mm de diâmetro) contendo estruturas do patógeno. Após quatro dias da inoculação, foram realizadas medições da área lesionada, através do comprimento e largura das lesões. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e dez repetições para cada fruto. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.6 Caracterização morfofisiológica

A fim de selecionar um meio que proporcionasse adequado crescimento micelial, foram testados os seguintes meios de cultura: BDA; CA (20 g de cenoura, 17 g de ágar e 1000 mL

ADE); V8 (200 mL de suco V8, 3 g de CaCO_3 , 17 g de ágar e 800 mL de ADE); CMA (20 g de fubá, 17 g de ágar e 1000 mL de ADE); e dois meios desenvolvidos para *Asperisporium caricae*, o FMA (200g de folhas de mamão e 17 g de ágar) e o CFMA (200g de mamão verde e 17 g de ágar) (SILVA, 2010).

Foram utilizadas 10 placas para cada tratamento e discos contendo micélio de *Pythium* sp. com 15 dias de idade foram repicados para o centro de cada placa contendo os diferentes meios de cultura. Posteriormente, as placas foram mantidas em temperatura de aproximadamente 25°C. Após 72 horas, foram realizadas medições do diâmetro das colônias e observação do aspecto do crescimento micelial.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (meios de cultura) e dez repetições. O programa estatístico usado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2010).

3.2.7 Caracterização molecular

3.2.7.1 Extração de DNA

Para obtenção da massa de micélio do isolado de *Pythium* sp., três discos de BDA contendo o micélio foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (50 ml), contendo 30 mL do meio Sacarose-Extrato de levedura-asparagina (sacarose 10 g.L⁻¹, asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,48 mg e $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,36 mg) (ZAUZA et al., 2007). As culturas foram incubadas por sete dias, sob a temperatura de 25±1°C, sem agitação, e fotoperíodo de 12 horas.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Doyle; Doyle (1987), onde o micélio do isolado foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo.

O micélio triturado foi transferido para dois tubos de micro-centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4 µL de β-mercaptoetanol, e depois, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1). Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentando 400 µL de etanol absoluto.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspenso com 40 µL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) +

RNAse (10µg/mL). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8%. O material foi armazenado sob a temperatura de -20°C.

3.2.7.2 Amplificação do DNA

A técnica empregada para a amplificação do rDNA foi a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados os oligonucleotídeos de sequenciamento específicos para oomicetos, COX1 OomCoxI-Levup (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') e Fm85mod (5' RRHWACKTGA CTDA TRATA CCAAA-3') (ROBIDEAU et al., 2011).

A reação de PCR foi preparada com tampão 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTP's 10 mM, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:20). O volume final da reação foi ajustado para 60 µL com água Milli-Q. As condições de termociclagem da PCR para amplificação da região COI ou Cox1 foram: desnaturação inicial a 95°C durante 2 min., seguida por 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 72°C durante 1 min., e extensão final a 72°C durante 10 min.

Após a amplificação, os produtos PCR da região Cox1 foi enviado para purificação e sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

3.2.7.3 Sequenciamento da região Cox1 e análise filogenética do isolado

A sequência foi inicialmente analisada com o algoritmo BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) para a identificação preliminar da espécie do patógeno com maior porcentagem de identidade. Posteriormente, foi editada com o auxílio do programa Staden Package (1998).

Para análise filogenética, o sequenciamento foi inicialmente alinhado utilizando o software MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no pacote computacional MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2011). O alinhamento da sequência serviu como base para construção filogenética, gerando uma árvore filogenética de “maximum Likelihood Tree” com o gene Cox1. A confiabilidade da árvore gerada foi obtida a partir 1000 repetições “bootstrap”. Sequências de outras espécies de *Phytium* disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Tabela 1) foram incluídas nas análises. A árvore foi utilizada para determinar o estado taxonômico do isolado. A espécie *Phytophthora drechsleri* (CBS119.80) foi utilizada como grupo externo (outgroup).

Tabela 1 – Espécies de *Pythium* spp. obtidos do GenBank usados para este estudo.

| Espécies ¹ | Número de acesso ² |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Pythium cucurbitacearum</i> | HQ708428.1 |
| <i>Pythium periilum</i> | HQ708781.1 |
| <i>Pythium graminicola</i> | HQ708589.1 |
| <i>Phytophthium chamaehyphon</i> | HQ708421.1 |
| <i>Pythium oopapillum</i> | FJ655179.1 |
| <i>Pythium mamillatum</i> | AB512918.1 |
| <i>Pythium chamaehyphon</i> | GU133523.1 |
| <i>Pythium vexans</i> | GU133518 |
| <i>Pythium deliense</i> | HQ708566.1 |
| <i>Pythium myriotylum</i> | KF761209.1 |
| <i>Pythium monospermum</i> | HQ708743.1 |
| <i>Pythium acanthicum</i> | HQ708459.1 |
| <i>Pythium hydnosporum</i> | HQ708608.1 |
| <i>Pythium nagaii</i> | JX397977.1 |
| <i>Pythium irregulare</i> | GU071822.1 |
| <i>Pythium mamillatum</i> | GU071819.1 |
| <i>Pythium debaryanum</i> | HQ708565.1 |

¹ Espécies e ² números de acesso dos mesmos no GenBank – NCBI.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Incidência da doença no campo

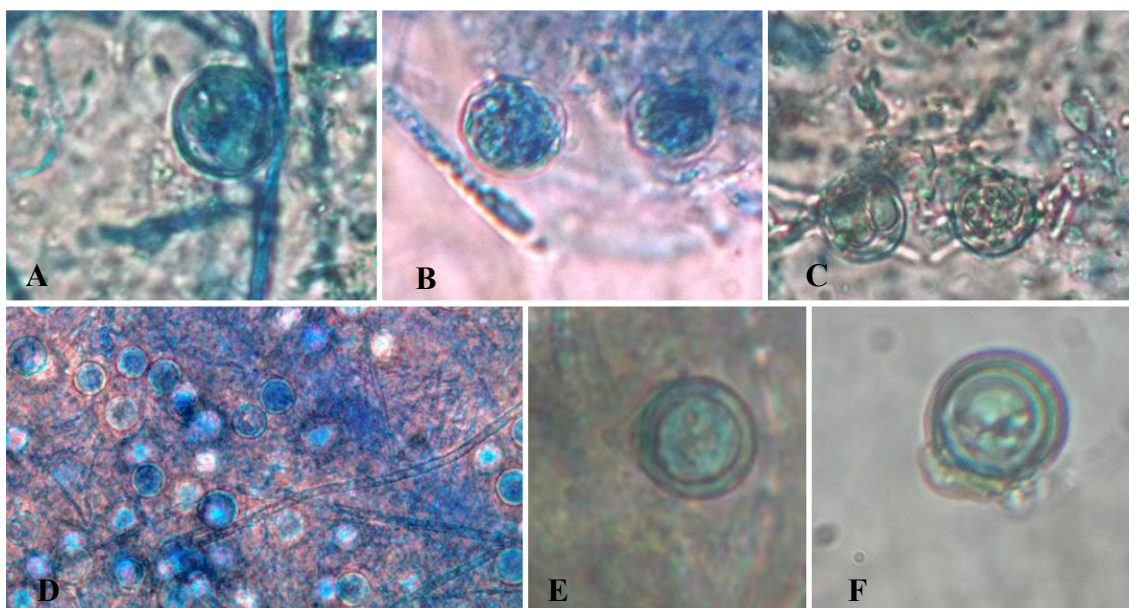
De acordo com o levantamento de incidência da doença no campo, as plantas de mamoeiro apresentaram tombamento de 20,2%. Entretanto, nas áreas avaliadas forma observadas muitas plantas com sintomas aparente na parte aérea, tais como, murchamento, amarelecimento das folhas e subdesenvolvimento das plantas.

3.3.2 Identificação e caracterização morfológica do isolado

No presente estudo, obteve-se um isolado de *Pythium* e a constatação em nível de gênero do agente causal da podridão de raízes e colo do mamoeiro pôde ser confirmada, visto que, o

isolado apresentou todas as estruturas características do gênero. Os esporângios, mostraram-se globosos, não papilados, com diâmetro variando de 11,04 – 21,01 μm (média = 16,20); oósporos apleróticos, esféricos com 12,17 – 19,49 μm diâmetro (média = 14,77) μm); parede lisa e dupla com 1,64 μm de espessura; oogônio esférico com 12,24 – 18,88 μm de diâmetro (media =16,04); anterídios presentes, sendo encontrado 1 por oogônio (Figura 5).

Figura 5 – Estruturas propagativas de *Pythium cucurbitacearum*. Esporângios (A-C); oósporos (D-E); oogônio com anterídio (F).



Fonte: Autora, 2014.

De acordo com a chave taxonômica proposta por Van der Plaats-Niterink (1981), as descrições morfológicas da espécie do isolado de *Pythium* aproximaram-se da espécie *chamaehyphon*, entretanto, esta espécie possui esporângios e oósporos maiores. O autor ainda destacou que *P. chamaehyphon* é muito próximo de *P. vexans* e *P. cucurbitacearum*, no entanto, o primeiro, apresenta oogônios maiores e uma diferença no contato do anterídio com o oogônio, e o segundo apesar da semelhança do ponto de contato do anterídio com oogônio, diferem no formato dos esporângios, por serem papilados.

De um modo geral, as espécies de *Pythium* são microrganismos que apresentam hifas não septadas e estruturas de reprodução assexuada e sexuada. Na reprodução assexuada, as espécies produzem esporângios e, tais estruturas, podem variar de filamentosa a globular. Com a maturação, os esporângios podem germinar e produzir hifas ou ainda originar uma vesícula, onde são produzidos os esporos móveis assexuados chamados de zoósporos. No entanto, na reprodução sexuada as estruturas reprodutivas incluem o oogônio (estrutura feminina),

anterídio (estrutura masculina) e o oósporo (esporo sexual) (ALLEN; MARTINEZ; BURPEE, 2004).

3.3.3 Patogenicidade

Nos testes realizados em frutos, aos 4 dias após a inoculação, foram observados sintomas iniciais de podridão, de aspecto amolecido e crescimento cotonoso de coloração esbranquiçada, foi evidenciado (Figura 6). Foi feito o reisolamento e o material plaqueado apresentou as mesmas características, confirmando, dessa forma, que a espécie de *Pythium* estudada pode causar podridão em frutos de mamoeiro.

De acordo com Agrios (2005), é comum à ocorrência de podridão ocasionada por *Pythium* spp., em frutos, e a infecção por sua vez, resulta em crescimento micelial de aspecto felpudo sobre a superfície do órgão e aparência aquosa apodrecida.

Figura 6 – Fruto de mamão com aspecto de podridão aquosa, com crescimento cotonoso de coloração esbranquiçada, após quatro dias da inoculação.



Fonte: Autora, 2014.

O isolado de *Pythium* mostrou-se patogênico às plantas em inoculadas nos dois métodos de inoculação. Após 10 dias, as plantas que receberam ferimento no caule inoculadas com um disco contendo micélio, apresentaram lesões características de podridão na região do colo, conforme pode ser visto na Figura 7. A partir do quarto dia, algumas plantas que tiveram seu sistema radicular imerso na suspensão de micélio apresentaram murcha; e após quinze dias, apresentaram lesões de apodrecimento no sistema radicular e posterior tombamento (Figura 8).

Figura 7 – Planta de mamoeiro em desenvolvimento no viveiro aos dez dias após a inoculadas, apresentando lesão no colo (A); detalhe da lesão (B).



Fonte: Autora, 2014.

Figura 8 – Planta de mamoeiro aos quatro dias após a inoculação. Sintoma de murcha (A); sistema radicular lesionado (B); planta tombada (C).



Fonte: Autora, 2014.

Tais resultados confirmam a capacidade de *Pythium*, em causar doença em mudas de mamoeiro. Durante o processo de infecção foi observado a destruição parcial ou total do sistema radicular das plantas infectadas. De acordo com Oluma; Oladiran (1993), infecções causadas por *Pythium* sp. em mamoeiro apresentam sintomatologia de raízes escurecidas de coloração marrom, ausência de raízes secundárias e desintegração do tecido interno da raiz principal, declínio progressivo da parte aérea da planta, culminando com o tombamento e morte da mesma.

O desenvolvimento destes sintomas assemelham-se aos de podridão de raízes de mamoeiro ocasionado por *Phytophthora palmivora*, estudados por Carnaúba et al. (2006); Tocafundo (2008). Resultados semelhantes foram relatados por Koffi et al. (2010), quando comprovaram a patogenicidade de *P. aphanidermatum* causando a podridão do colo e raízes em mamoeiro na Costa do Marfim.

3.3.4 Virulência de *Pythium* em diferentes hospedeiros

O teste de patogenicidade cruzada revelou a capacidade de *P. cucurbitacearum*, em causar lesões em frutos de melão, pepino, tomate e tubérculos de batata (Figura 9). Estes resultados indicam a não especificidade patogênica do isolado testado, não sendo, portanto, apenas patogênico a frutos de mamão, uma vez que este foi isolado de plantas de mamoeiro. De acordo com a análise dos dados, frutos de melão, pepino e tomate apresentaram diâmetros maiores quando comparado com tubérculos de batata, contudo, não diferiu dos frutos de mamão (Tabela 2).

Segundo Plaats-Niterink (1981), muitas espécies de *Pythium* podem parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, enquanto que outras são restritas a apenas uma espécie de hospedeiro. Um exemplo é a espécie *P. aphanidermatum* que, de acordo com Lodhi et al (2013), pode ser isolado de várias espécies vegetais e ocasionar perdas em diversas culturas. No Japão, a espécie *P. cucurbitacearum* já foi relatado causando doença em tomate e batata (PLAATS-NITERINK, 1981).

Figura 9. Frutos inoculados com o isolado de *Pythium cucurbitacearum* obtido de mamoeiro com sintomas de podridão de colo, após quatro dias de inoculação: (a) fruto de mamão (*Carica papaya* L.); (b) melão (*Cucumis melo* L.); (c) tomate (*Solanum lycopersicum* L.); (d) pepino (*Cucumis sativus* L.); (e) batata (*Solanum tuberosum* L.).

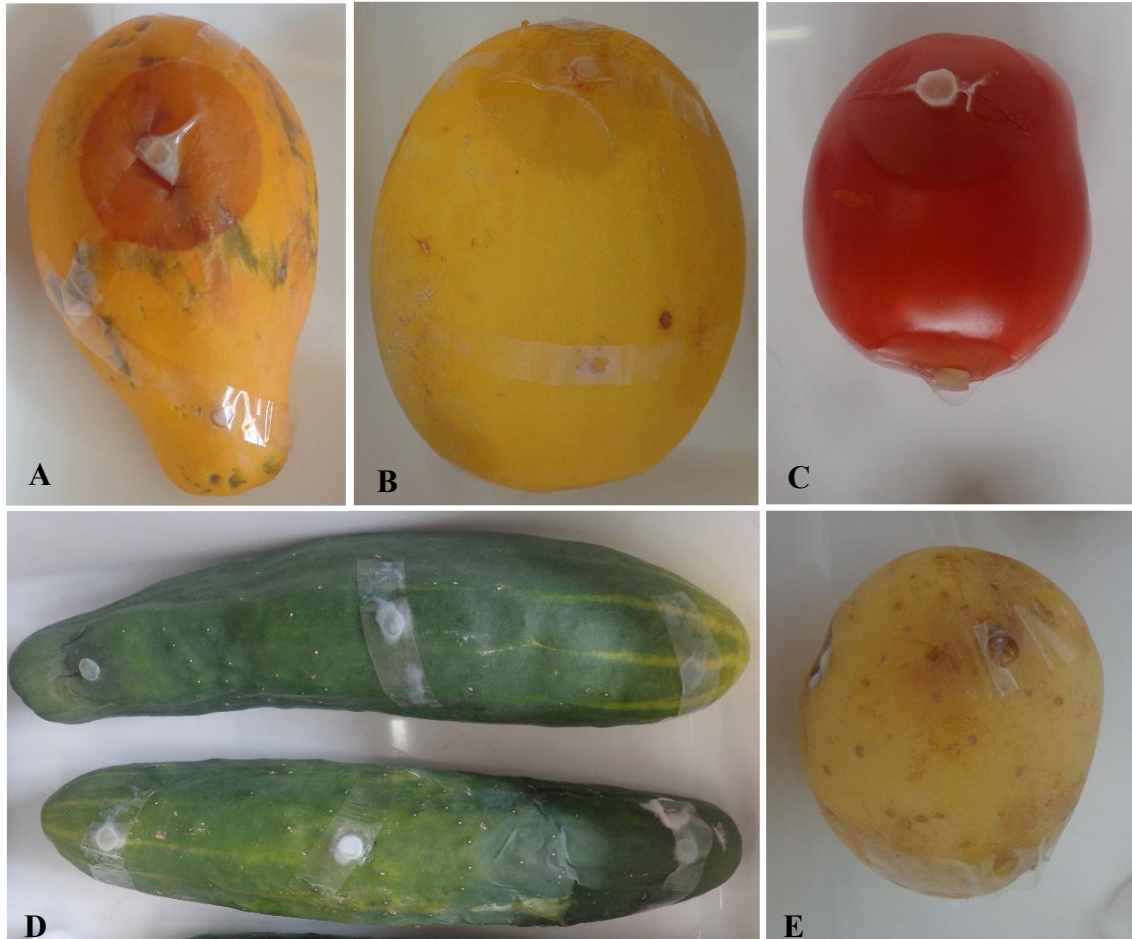


Foto: Autora (2014).

Tabela 2 – Média do diâmetro das lesões (cm) causadas pela infecção cruzada do isolado de *Pythium cucurbitacearum* em diferentes hospedeiros.

| Frutos inoculados com <i>P. cucurbitacearum</i> | Diâmetro das lesões (cm) |
|---|--------------------------|
| Pepino | 6,23 ± 0,62 a |
| Tomate | 5,59 ± 0,18 a |
| Melão | 4,72 ± 1,65 a |
| Mamão | 3,54 ± 0,71 ab |
| Batata | 0,78 ± 0,35 b |
| CV (%) | 0,99 |

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Média ± o erro padrão.

3.3.5 Caracterização morfofisiológica

3.3.5.1 Influência dos meios de cultura sobre o aspecto das colônias e crescimento micelial de *Pythium* sp.

De acordo com as análises estatísticas, os diâmetros de crescimento micelial não mostraram diferenças significativas entre os meios BDA, CA, V8, CMA, CFMA e FMA (Tabela 3). Desse modo, todos os meios testados foram eficazes para o desenvolvimento do patógeno, proporcionando um bom crescimento micelial. Após 72 horas, as placas já mostraram máximo crescimento, e, após sete dias, pôde ser feita visualizações de micélio aéreo nas colônias, variando de ralo a cotonoso, conforme pode ser visto na figura 10.

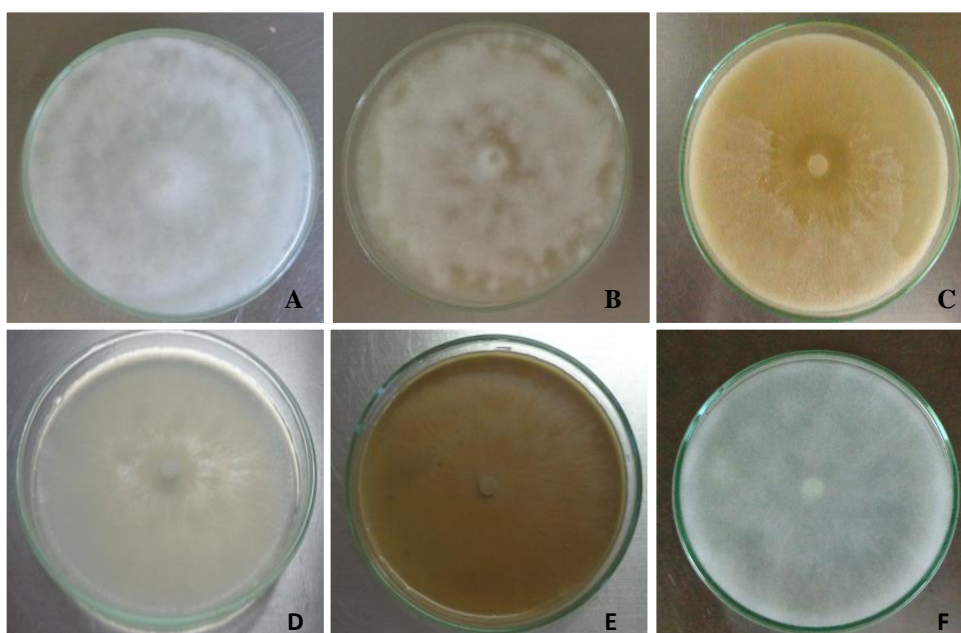
As observações microscópicas mostraram pouca produção de esporângio nos meios estudados, com exceção do BDA, o qual não foi visualizada a produção de esporângios, apenas oosporos. Este, por sua vez, foi abundante em todos os meios utilizados. Entretanto, em nenhum dos meios testados foi observada diferenças morfológicas nas estruturas.

Tabela 3 – Média dos diâmetros das colônias (cm) de *Pythium* sp. em seis meios diferentes, após 96 horas de cultivo.

| Meios | Crescimento micelial diâmetro (cm) |
|----------------|------------------------------------|
| BDA | 8,63 ±0,07 |
| CA | 8,81 ±0,12 |
| V8 | 8,92 ±0,04 |
| CMA | 8,57 ±0,19 |
| CFMA | 8,72 0,22 |
| FMA | 8,46±0,10 |
| Teste F | 1,37 ^{ns} |
| CV% | 3,66 |

^{ns} - Não significativo. Média ± o erro padrão.

Figura 10 – Aspecto das colônias de *Pythium* sp. aos dez dias, em diferentes meios de cultura: BDA (A); CA (B); V8 (C); CFMA (D); FMA (E) e CMA (F).



Fonte: Autora, 2014.

Um dos trabalhos pioneiros referentes ao desenvolvimento de espécies de *Pythium* em meios de cultura foi realizado por Van der Plaats-Niterink (1981). Este autor, por sua vez, destacou o meio de fubá ágar (CMA) para um bom desenvolvimento de estruturas reprodutivas do patógeno. Aparecido; Camilo; Vaz Lobo (2013), obtiveram abundante produção de oósporos no meio V8 e destaca o meio como indutor na formação dessas estruturas.

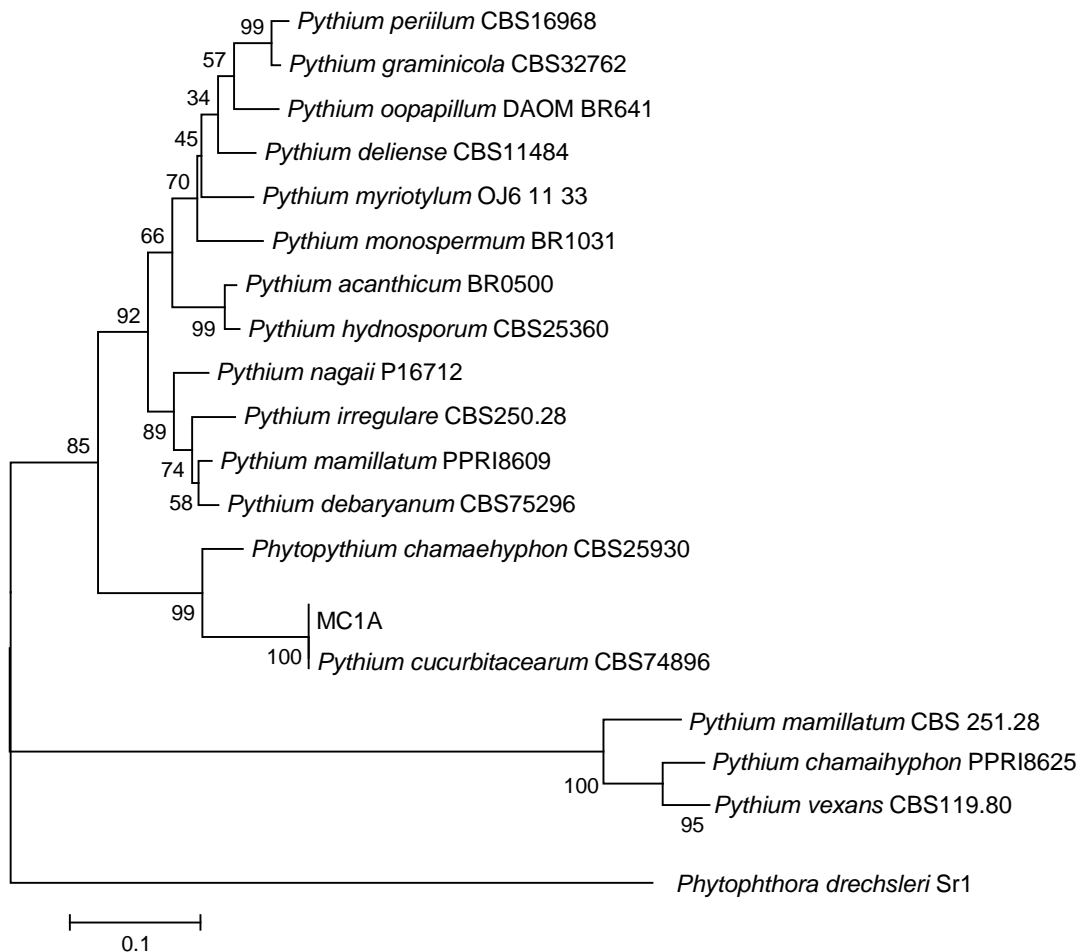
3.3.5 Caracterização molecular

3.3.5.2 Amplificação do DNA, purificação e sequenciamento dos produtos da PCR

O produto da amplificação da PCR com os primers OomCoxI-Levup e Fm85mod (sequência MC1A) resultou num fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb). O sequenciamento do isolado utilizado no presente estudo apresentou identidade de 99% com a sequência de *P. cucurbitacearum* depositada no GenBank (CBS74896).

A análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região citocromo c oxidase subunidade I (Cox1) do DNA do isolado, usando o método de “maximum Likelihood Tree” com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, mostrou 100% de similaridade genética com *P. cucurbitacearum* (Figura 11).

Figura 11 – Árvore filogenética baseada na região citocromo c oxidase subunidade I (Cox1) do DNA, do isolado de *Pythium* (MC1A), construída usando o método de “maximum Likelihood Tree”. O isolado *Phytophthora drechsleri* foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,1 e valores de suporte de bootstrap de 1000 repetições são apresentados nos ramos.



Os resultados são aceitáveis para conclusão em nível de espécie, pois, o valor de similaridade de 100% é considerado adequado. Ho et al. (2012), estudando a ocorrência e distribuição de espécies de *Pythium*, determinaram que apenas isolados com pelo menos 97% de identidade com espécies de *Pythium* conhecidos no GenBank fossem aceitas. Lestari et al. (2013), objetivando a identificação filogenética de isolados de fungos patogênicos a macieira, destacaram valores de similaridade de 99% para conclusão a nível de espécie de *Pythium*.

Robideau et al. (2011), destacaram que, comumente, a região do DNA a ser utilizada para a identificação dos oomicetos ao nível de espécie é o espaço interno transcrito (ITS) da região de rDNA. Contudo, os autores destacaram que em alguns casos o citocromo c oxidase subunidade I (COI ou Cox1) apresenta-se mais discriminativo em nível de espécie.

Lévesque e de Cock (2004), estudando a taxonomia e filogenia molecular de espécies do gênero *Pythium*, destacaram que a espécie *P. cucurbitacearum* está classificada no mesmo Clado, que engloba as espécies *P. boreale*; *P. oedoichilum*, *P. chamaehyphon*, *P. helicoides*, *P. vexans* e *P. Indigoferae*, no qual as espécies apresentam algumas características morfológicas congruentes. Comumente, tais espécies apresentam esporângios ovóides e muitas vezes papilados.

Contudo De Cock et al. (2012), em um estudo comparativo da taxonomia morfológica após revisão molecular, destacaram que a análise das sequências das espécies do Clado em questão, mostraram-se estar muito próxima ao gênero *Phytophthora*, por conta da semelhança dos esporângios e dos oogônios. Entretanto, a descarga de zoósporos é semelhante a *Pythium*, com a possibilidade de se tratar de um gênero intermediário, sugerido como *Phytopythium*. Os autores ainda destacaram que os esporângios desse Clado podem ser globosos a ovóides com papilas.

Segundo Ho et al. (2012), a espécie *P. cucurbitacearum* raramente tem sido relatada no mundo e sua taxonomia é controversa. A espécie foi relatada pela primeira vez por Takimoto (1941), no Japão, causando tombamento de plântulas e podridão mole em frutos de pepino, e apresentou como principais características, esporângios esféricos ou ovóides papilados, o que corrobora, em parte, com os resultados morfológicos do presente estudo, visto que, o isolado de *Pythium* estudado mostrou-se globoso, porém, não foram visualizados esporângios do tipo ovóides papilados.

3.4 CONCLUSÕES

- ✓ O oomyceto *P. cucurbitacearum*, é agente causal da podridão das raízes e do colo do mamoeiro, e causa danos em plantas em desenvolvimento;
- ✓ O isolado mostra-se patogênico aos frutos de mamão, pepino, tomate, melão e tubérculos de batata;
- ✓ Os meios de cultura BDA, CA, V8, CMA, CFMA e FMA proporcionam bom desenvolvimento à espécie de *Pythium* estudada;
- ✓ O isolado apresenta 100% de similaridade com a espécie *P. cucurbitacearum*.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 922 p.

ALLEN, T. W.; MARTINEZ, A.; BURPEE, L. L. *Pythium* blight of turfgrass. **The Plant Health Instructor**, 10, 1094, 2004.

ALVARADO, G. R. et al. *Pythium aphanidermatum* Causing Collar Rot on Papaya in Baja California Sur, Mexico. **Plant Disease**, v. 85, n.4, p. 444.3, 2001.

APARECIDO, C.C.; CAMILO, C.; VAZ LOBO, R. S. Preservação de *Pythium* e *Phytophthora* a -80° C. **Divulgação técnica**, Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, v.75, n.1, p.5-10, 2013.

BARRETO, P.D.; SANTOS, A. A. CMF 056 - Genótipo de Mamoeiro com Potencial para Cultivo no Ceará. **Comunicado Técnico - EMBRAPA**, Fortaleza, CE. 2002.

CARNAÚBA, P. J. et al. *Phytophthora palmivora*, agente da podridão de raiz e frutos de mamoeiro no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 134-135, 2006.

COSTA, R. C. et al. Ocorrência de *Pythium* sp. em mamoeiro no Estado do Pará. In: **Jornada de Iniciação Científica do Pet**, 2., PA. 2007.

DANTAS, J. L. L.; JUNGHANS, D. T.; LIMA, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, 2013, p. 95-120.

DE COCK, A. et al. *Pythium*: morphological taxonomy after the molecular revision. **CBS - Centraalbureau Voor Schimmelcultures**, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EDGAR, R. C. MUSCLE. A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 19, n. 5, p. 113, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.6. Lavras-MG: UFLA, 2010.

HO, H. H. et al. The occurrence and distribution of *Pythium* species on Hainan Island of South china. **Botanical Studies**, v.53, p. 525-534, 2012.

KOFFI, C. N. B. et al. *Occurrence of Pythium aphanidermatum* Root and Collar Rot of Papaya (*Carica papaya* L.) in Côte d'Ivoire. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, p.62-67, 2010.

LESTARI F.W.; SUHARJONO; ARUMINGTYAS E.L. Phylogenetic identification of pathogenic fungi from apple in Batu City, Malang, Indonsia. **Advances In Microbiology**, v .3, p.69-75, 2013.

LÉVESQUE C.A; De COCK A.W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research** 108: 1363–1383, 2004.

LODHI, A.M. et al. Prevalence of *Pythium aphanidermatum* in Agro-ecosystem of sindh provence of Pakistan. **Pak. J. Botany**, v.45, n.2, p.635-642, 2013.

MEISSNER FILHO, P. E. et al. Doenças. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, 2013, p. 95-120.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. Doenças in: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Mamão Fitossanidade. **Comunicação para Transferência de Tecnologia - EMBRAPA**, Brasília, p.37-46, 2000.

OLUMA, H.; OLADIRAN, A. *Pythium aphanidermatum* root rot of papaia (*Carica papaya* L.) in Nigeria. **Mycopathologia**123, p.111-115, 1993.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Mamão fitossanidade. **Comunicação para Transferência de Tecnologia - EMBRAPA**, Brasília, 2000. 91 p.

ROBIDEAU, G. P. et. al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. **Molecular Ecology Resources**, p. 1002-1011, 2011.

ROSA, D. D. et al. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando

sequências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 190-193, 2006.

SILVA, L. G. **isolamento e crescimento de *Asperisporium caricae* e sua relação filogenética com mycosphaerellaceae**. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010.

STADEN R., K. F.; BEAL, J.K.; BONFIELD, The Staden Package. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115-130, 1998.

TAKIMOTO, S. On the *Pythium* causing damping-off of seedlings and fruit rot of cucumber. **Japanese Journal of Phytopathology**. v.11, n.2, p.89-91, 1941.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011.

TOCAFUNDO, F. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2008.

VAN DER PLAATS-NITERINK A.J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, n. 21, 242 p. 1981.

VILLA, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, p.410-422, 2006.

WANG, P.H.; WANG, Y.T.; E WHITE, J.G. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 127-132. 2003.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. PCR Protocols: A guide to methods and applications. **Academic Press**, New York, p. 315-322. 1990.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 382 p.

4 EFICIÊNCIA DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Pythium cucurbitacearum*, CAUSADOR DA PODRIDÃO DA RAIZ E DO COLO DO MAMAOEIRO (*Carica papaya* L.)

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de produtos alternativos em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*, causador da podridão da raiz e do colo do mamoeiro. Foram realizados dois bioensaios, onde, no primeiro, foram avaliados os óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), eucalipto glóbulos (*Eucalyptus globulus* L.) e o indutor Ecolife® nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. No segundo, foram avaliados o extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) nas concentrações de 5% (5 mg. mL^{-1}), 10% (10 mg. mL^{-1}), 15% (15 mg. mL^{-1}) e 20% (20 mg. mL^{-1}); e óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) emulsificado, obtido a partir da extração a frio de sementes (Natuneem®) nas concentrações de 5; 10; 15 e 20%. A atividade fungitóxica dos tratamentos foi determinada por meio das medições do diâmetro das colônias do patógeno após 96 horas da instalação do experimento. O delineamento experimental adotado para os óleos essenciais e Ecolife® foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x6) + testemunha, totalizando 25 tratamentos; e para o extrato aquoso de alho e o Natuneem® em esquema fatorial (2x4) + testemunha, totalizando 9 tratamentos. Para os dois bioensaios utilizaram-se cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para as variáveis qualitativas, e quantitativas aplicou-se regressão. Os produtos alternativos apresentaram efeito fungitóxico sobre a espécie de *Pythium* estudada, mostrando-se eficiente no controle *in vitro* do patógeno. O óleo essencial de hortelã-pimenta e o indutor Ecolife® apresentaram ação fungicida quando utilizados nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O extrato aquoso de alho na menor concentração testada de 5% (5 mg. mL^{-1}) proporciona efeito fungitóxico e fungicida, sendo superior ao produto comercial Natuneem® na mesma concentração.

Palavras-chave: Mamão. Óleos essenciais. Extratos vegetais.

EFFICIENCY OF ALTERNATIVE PRODUCTS AND INDUCER OF RESISTANCE IN CONTROL IN VITRO OF *Pythium cucurbitacearum*, CAUSAL AGENT OF STEM ROT AND ROOTS OF PAPAYA (*Carica papaya* L.)

ABSTRACT

This work was carried out to evaluate the effect of alternative products in different concentrations on mycelial growth of *Pythium cucurbitacearum*, causal agent of stem rot and in roots of papaya. Two experiments were performed, in the first, were assessed essential oils of peppermint (*Mentha piperita* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* L.), Eucalyptus globules (*Eucalyptus globulus* L.) and the inducer Ecolife® at the concentrations 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 and 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. In second, were evaluated the aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) at concentrations of 5% (5 mg.mL^{-1}), 10% (10 mg.mL^{-1}), 15% (15 mg.mL^{-1}) and 20% (20 mg mL^{-1}); and neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) emulsified, obtained from cold extraction of seeds (Natuneem®) at concentrations of 5; 10; 15 and 20%. The fungitoxic activity of the treatments was determined by means of measurements of the colony diameter of pathogen after 96 hours of the experiment. The experimental design for the essential oils and Ecolife® was completely randomized in factorial (4x6) + control, totaling 25 treatments; and the aqueous extract of garlic and Natuneem® in factorial (2x4) + control, totaling nine treatments. For the two experiments were used five replicates. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% probability. For qualitative variables; and applied regression to quantitative variables. Alternative products submitted fungitoxic effect on the specie of *Pythium* studied, being effective in controlling the pathogen *in vitro*. The essential oil of peppermint and the inducer Ecolife® submitted fungicidal action when used in concentrations of 2 and 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The aqueous extract of garlic at the lowest tested concentration of 5% (5 mg.mL^{-1}) provides fugitoxic and fungicidal effect, higher than the commercial product Natuneem® at the same concentration.

Keywords: Papaya. Essential oils. Plant extracts.

4.1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie tropical de grande expressão econômica, com excelente aceitação de mercado. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, com 12,2% da produção global, correspondendo a mais de 1,5 milhões de toneladas, numa área de 31,3 mil hectares (FAO, 2012). A região Nordeste engloba mais de 60% da produção nacional, com destaque para o Estado da Bahia com mais de 45% dessa produção (IBGE, 2014).

As doenças do mamoeiro acarretam sérios prejuízos à cultura, destacando-se, dentre elas, a podridão das raízes e do colo do mamoeiro. A doença pode ser causada por diversos patógenos habitantes de solo, como por exemplo, os oomicetos *Pythium* sp. e *Phytophthora palmivora* (MEISSNER FILHO et al., 2013; OLIVEIRA, 2000).

O controle do tombamento de plântulas é realizado mediante a utilização de fungicidas e a desinfestação química do substrato. Para os oomicetos *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. o químico Fosetyl-Al no tratamento de solo e via foliar, e o Metalaxyl no tratamento de sementes, são os mais recomendados pela eficiência apresentada; entretanto, o surgimento da resistência do patógeno é uma das desvantagens da utilização desses fungicidas (MICHEREFF; ANDRADE; PERUCH, 2005).

A utilização de produtos vegetais com propriedades fungicidas poderá constituir um método alternativo e promissor no controle de doenças de plantas, pois, além de serem de fácil obtenção e baixo custo, minimizam os problemas de toxicidade apresentados pelos produtos químicos sintéticos (ROMERO et al., 2009), podendo minimizar o aparecimento de microrganismos resistentes e a contaminação do meio ambiente (AMORIM et al., 2011).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odorífera e líquida. Frequentemente apresentam odor agradável e marcante; e são importantes substâncias orgânicas, fonte de matérias-primas para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (MORAIS, 2009; OOTANI, 2013).

Os extratos vegetais são preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, e podem ser preparados por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando frequentemente como solvente, o etanol ou a água (ANVISA, 2009). Os extratos podem conter na sua composição, moléculas complexas, como, compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides que são sintetizados pelo metabolismo secundários das plantas e são

de grande importância nas relações ecológicas entre as próprias plantas, plantas e animais e plantas e microrganismos fitopatogênicos (DINIZ et al., 2006).

A utilização de produtos alternativos, como os óleos essenciais e extratos vegetais vêm sendo testados com êxito no controle de fitopatógenos, principalmente, em algumas espécies de fungos, tanto na pós-colheita (RIBEIRO; BEDENDO, 1999; CARNELOSSI, 2009; ANARUMA et al., 2010), quanto em espécies de fungos radiculares ou habitantes do solo, como *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia solani* (SILVA et al., 2009; BENINI et al., 2010; HILLEN et al., 2012; SARMENTO-BRUM et al., 2013). Entretanto, em oomicetos existem poucos estudos abordados com a utilização desses produtos.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.); indutor Ecolife®; extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) e do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) emulsificado obtido a partir da extração a frio de sementes (Natuneem®), em diferentes concentrações, na inibição do crescimento micelial de *P. cucurbitacearum* causador da podridão da raiz do colo do mamoeiro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em Rio Largo-AL (9° 27'57" de latitude Sul, 34° 50'1" de longitude Oeste e 127 m de altitude).

4.2.2 Obtenção dos produtos alternativos

O extrato vegetal aquoso de alho foi preparado pesando-se 10g do material e triturando-o em 100 mL de ADE em liquidificador por um período de 10 minutos. Posteriormente, o material foi filtrado em gaze dupla e papel de filtro whatman nº1, sendo utilizado em seguida.

O óleo de nim emulsificado obtido a partir da extração a frio de sementes (Natuneem®, Natural Rural Ltda., Araraquara-SP, Brasil) e os óleos essenciais de citronela, eucalipto e hortelã-pimenta foram adquiridos de forma comercial, produzido por BioEssencia (Óleos Essenciais Ltda., Jaú-SP, Brasil).

O indutor de resistência Ecolife®, produto a base de biomassa cítrica, também foi adquirido de forma comercial e o produto foi fornecido por Quinabra S.A. (Química Natural Brasileira, São José dos Campos – SP, Brasil).

4.2.3 Efeito dos produtos sobre o crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*

Os produtos foram adicionados ao meio de cultura Cenoura Agar (CA), fundente (aproximadamente 45°C) e vertidos em placas de Petri. Foram utilizadas concentrações de 5, 10, 15 e 20 % para o extrato aquoso de alho e para Natuneem[®]; e 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para os óleos essenciais e Ecolife[®]. Placas contendo apenas meio CA sem adição dos tratamentos serviram como testemunha.

No centro de cada placa foi depositado um disco de meio CA de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélio jovem, com sete dias de idade, retirado das bordas de colônias de *P. cucurbitacearum*.

A atividade fungitóxica dos tratamentos foi determinada por meio das medições do diâmetro das colônias do patógeno após 96 horas da instalação do experimento. A Percentagem de Inibição do Crescimento micelial (P.I.C.) foi determinada segundo Edginton et al. (1971): $\text{P.I.C.} = [(\text{crtest} - \text{crtrat}) / \text{crtest}] \times 100$, onde: cresc. test. = Crescimento micelial da testemunha; cresc. trat. = Crescimento micelial do tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x6) + testemunha (óleos essenciais e Ecolife[®] x concentrações), totalizando 25 tratamentos com cinco repetições, para os óleos essenciais e Ecolife[®]. E para o extrato aquoso de alho e o Natuneem[®], em esquema fatorial (2x4) + testemunha (extrato e Natuneem[®] x concentrações), totalizando 9 tratamentos com cinco repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para as variáveis qualitativas; e para as quantitativa aplicou-se regressão polinomial. O programa estatístico usado foi o SISVAR versão 5,6 (FERREIRA, 2010).

Para verificar o efeito fungicida ou fungistático dos produtos testados, os discos de inóculo a partir dos quais não apresentaram crescimento micelial, foram transferidos após a avaliação (96 horas) para placas de Petri contendo CA, sem a presença do agente inibidor e incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e sob luz constante. Após 96 horas, foi avaliado quanto à presença ou não de crescimento do microrganismo.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum* com óleos essenciais e Ecolife®

O efeito da interação dos óleos essenciais e do Ecolife® sob diferentes concentrações, na porcentagem de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *P. cucurbitacearum*, mostrou-se significativo ($p < 0,01$). Desse modo, as variáveis foram desdobradas para os óleos essenciais e Ecolife® dentro de cada concentração, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), conforme pode ser visto na Tabela 4; e para porcentagem de inibição do crescimento micelial, em função das concentrações utilizadas para cada produto, aplicou-se regressão.

A testemunha apresentou 100% de crescimento micelial, ou seja, zero de inibição de crescimento do patógeno, o que já era previsto, em virtude do meio de cultura utilizado, pois, o mesmo, proporciona ao patógeno adequado desenvolvimento. Na menor concentração estudada $0,125 (\mu\text{L}.\text{mL}^{-1})$, os produtos avaliados não proporcionaram inibição de crescimento micelial; todavia, na segunda menor dose, o óleo essencial de citronela, mostrou inibição de mais de 43,74%. Os óleos de hortelã, citronela e o indutor Ecolife® não apresentaram diferença significativa nas concentrações de 0,5; 1 e 2 ($\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) inibindo o crescimento micelial do patógeno, variando de 80 a 100%. Quando utilizado óleo essencial de eucalipto nas mesmas concentrações, observou-se baixa inibição do crescimento micelial (0 a 45%). Contudo, na maior concentração analisada, $4\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ os óleos e o Ecolife® mostraram-se eficientes, não diferindo significativamente proporcionando inibição de até 100% (Tabela 4).

Os resultados do presente estudo indicam a eficiência dos óleos essenciais de hortelã, citronela, eucalipto e o indutor Ecolife® no desenvolvimento *in vitro* do oomiceto *P. cucurbitacearum*. Provavelmente, o sucesso da inibição micelial deve-se a alguns componentes específicos dos produtos testados.

De acordo com Singh; Shushni; Belkheir (2011), a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de hortelã está, principalmente, associada aos compostos majoritários como o mentol e a mentona. Scherer (2009), destaca a forte ação antimicrobiana do óleo essencial de citronela, sendo esse majoritariamente composto pelo citronelal e o geraniol. Segundo Furtado et al. (2010), o produto comercial Ecolife®, composto de bioflavonóides cítricos, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico, pode atuar diretamente contra fitopatógenos. Vitte; Brito (2003), destacam o cineol ou citronelal como componente principal do óleo essencial de eucalipto. Brito et al. (2012), confirmaram a inibição dos fungos

Aspergillus sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Colletotrichum* sp., utilizando o composto citronelal.

De acordo com Costa et al. (2011), a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre alguns fungos fitopatogênicos, tais como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* está relacionada com sua hidrofobicidade, a qual os permitem interagir com os lipídios da parede, membrana celular e da mitocôndria, alterando a permeabilidade e causando distúrbios nessas estruturas.

Tabela 4 - Efeito da interação de óleos essenciais e Ecolife® sob diferentes concentrações ($\mu\text{L. mL}^{-1}$), na porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) de *Pythium cucurbitacearum*.

| Produtos | ----- Concentrações ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)----- | | | | | | |
|------------------|---|--------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 |
| Hortelã | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 b | 82,76 ± 1,59a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,0 a | 100,00 ± 0,00 a |
| Citronela | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 a | 43,74 ± 17,87a | 82,84 ± 16,84a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,0 a | 100,00 ± 0,00 a |
| Eucalipto | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 b | 0,00± 0,00 b | 0,00 a± 0,00 b | 45,9 ±22,23b | 75,2 ±10,90a |
| Ecolife® | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 a | 0,00± 0,00 b | 52,50 ± 2,42a | 65,17± 0,93 a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a |
| CV (%) | 35,09 | | | | | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Média ± o erro padrão.

Diversos trabalhos vêm atestando a eficiência de óleos essenciais na atividade antimicrobiana. Salgado et al. (2003), avaliando o efeito do óleo essencial de eucalipto, confirmaram a inibição do crescimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Carnellosi et al. (2009), também comprovaram sua eficiência na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*.

Anaruma et al. (2010), estudando óleos essenciais, observaram redução significativa do crescimento micelial do patógeno *C. gloeosporioides* pelo óleo essencial hortelã-pimenta.

Soriano (2011), estudando óleos essenciais de eucalipto, citronela e o Ecolife® sobre o crescimento micelial do oomiceto *Phytophthora* sp., observou uma inibição no crescimento micelial do patógeno superior a 80%, o que corrobora com os resultados obtidos nessa pesquisa.

De acordo com as análises de regressão, as inibições do crescimento micelial de *P. cucurbitacearum* diante das concentrações dos produtos estudados, apresentaram um melhor ajuste quadrático, exceto para o óleo essencial de eucalipto, que melhor se ajustou a uma equação linear.

A curva dose-resposta para o óleo essencial de hortelã, com um coeficiente de determinação de 80% entre a porcentagem de inibição do crescimento micelial e as concentrações do óleo, mostrou que concentrações a partir de $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentaram efeitos satisfatórios de inibição, entretanto, melhores porcentagens de inibição podem ser estimadas quando se utilizam as concentrações de 1; 2 e $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$, podendo-se dessa forma, proporcionar fungitoxidade de até 100%, contudo, a concentração de maior eficiência estimada para inibir 100% do crescimento micelial é de $2,63 \mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo essencial (Figura 12).

Para o óleo essencial de citronela, o efeito fungitóxico foi observado na segunda menor concentração estudada e manteve a atividade quando essas foram duplicadas, dessa forma, as concentrações entre 1 e $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$ inibiram totalmente o patógeno (Figura 13); e de acordo com o ajuste quadrático a concentração de $2,59 \mu\text{L.mL}^{-1}$ é a de maior eficiência na inibição micelial do patógeno.

As concentrações do óleo essencial de eucalipto apresentou comportamento linear com coeficiente de determinação de 93% sob a porcentagem de inibição do crescimento micelial. Dessa forma, as menores concentrações $0,125$; $0,5$ e $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$ não mostraram qualquer eficiência na porcentagem de inibição micelial do patógeno. No entanto, a partir de $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$, já foi possível observar os efeitos de inibição, que foi aumentada quando a concentração dobrou, podendo-se aferir que aumento nas concentrações do óleo podem proporcionar maiores porcentagens de inibição de crescimento micelial (Figura 14).

Para o indutor Ecolife[®], observou-se inibição micelial acima de 80% a partir de 0,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e atividade fungitóxica comprovada pela inibição micelial, podendo chegar em 100% com o aumento das concentrações (Figura 15). Contudo, a dose de maior eficiência calculada do indutor para inibição do patógeno é de 2,9 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

Figura 12 – Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.

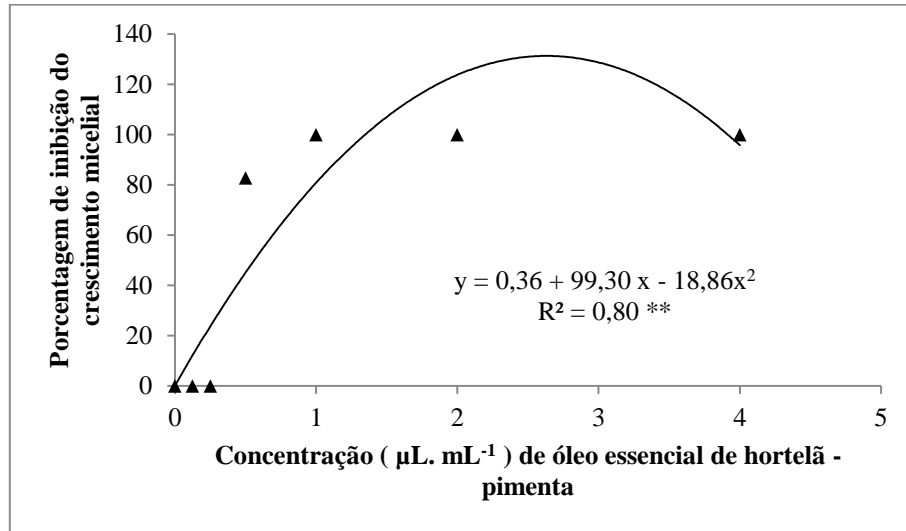


Figura 13 – Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.

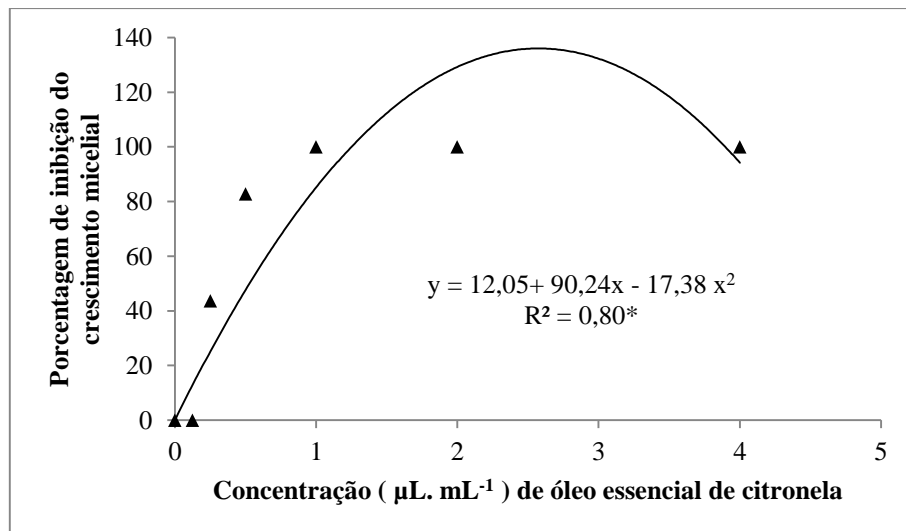


Figura 14 – Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus L.*) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.

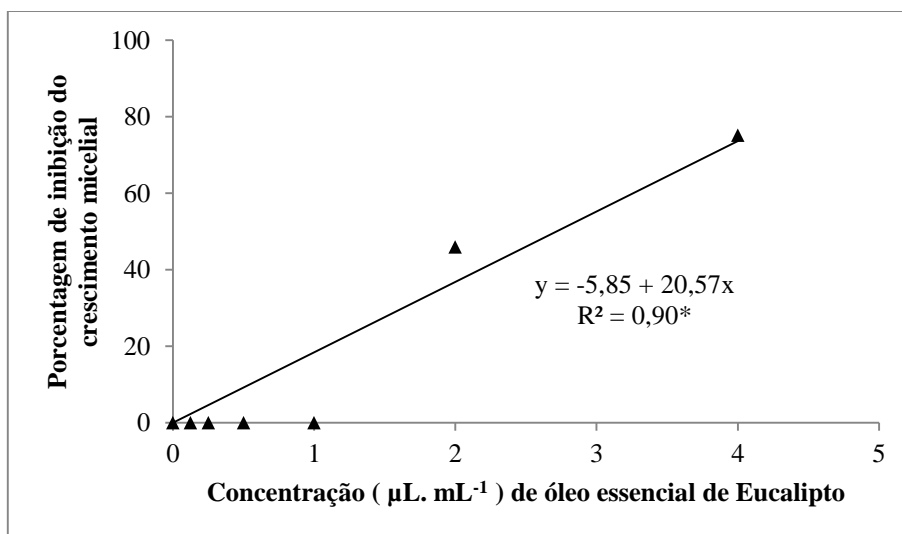
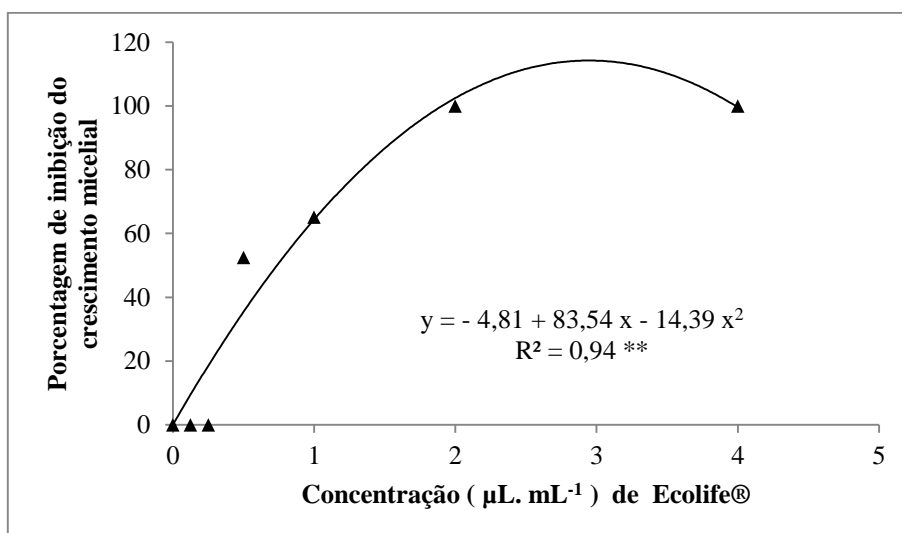


Figura 15 – Efeito de diferentes concentrações de Ecolife® na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.



O efeito das concentrações dos referidos produtos testados, indicam que a inibição do crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*, pode ser alcançada, mostrando que a quantidade de óleos essenciais e o indutor Ecolife® deve ser levada em consideração na atividade antimicrobiana exercida diretamente contra o patógeno.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com o observado por Sarmiento-Brum et al. (2013), ao estudar o efeito do óleo essencial de hortelã na inibição micelial de *Colletotrichum graminicolanas*, observaram que concentrações de 1 e 1,25 μL.mL⁻¹ foram capazes de inibir totalmente o desenvolvimento do patógeno.

Seixas et al. (2011), avaliaram o efeito do óleo essencial de citronela, ao utilizar alíquotas de 5, 10, 15, 20 e 25 µL/placa, comprovaram 100% de inibição do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* apenas nas maiores quantidades estudadas, alíquotas de 15 a 25 µL.

Segundo Piaty; Schneider; Nozaki (2011), pesquisaram o efeito do óleo essencial de eucalipto sobre o crescimento e desenvolvimento *Penicillium* sp, e verificaram que o óleo possui capacidade de inibição micelial do patógeno em concentrações superiores a 0,25%, destacando a eficiência da referida concentração no controle do fungo.

4.3.2 Inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum* com extrato aquoso de alho e Natuneem®

Os resultados da análise de variância revelaram interação significativa entre o extrato de alho, o produto comercial Natuneem® e as concentrações utilizadas, sobre a inibição do crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*. O desdobramento mostrou diferenças entre os extratos nas concentrações de 5 e 10%, enquanto que, nas concentrações entre 15 e 20%, a inibição do crescimento micelial foi de 100% para os produtos (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da interação do extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) e Natuneem® sob diferentes concentrações (%), na porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) de *P. cucurbitacearum*.

| Produto | ----- Concentrações (%)----- | | | | |
|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| Extrato de Alho | 0,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a |
| Natuneem® | 0,00 ± 0,00 a | 30,54 ± 6,45b | 45,5 ± 4,39 b | 100,00 ± 0,00 a | 100,00 ± 0,00 a |
| CV (%) | 8,17 | | | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Média ± o erro padrão.

De acordo com as análises de regressão, as referidas concentrações influenciaram na porcentagem de inibições do crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*. Para o extrato aquoso de alho, a dose-resposta obteve um ajuste quadrático com um coeficiente de determinação de 85%. Desse modo, concentração de 5 % do extrato, adicionado ao meio, pode estimar mais de 74% de inibição micelial, e a concentração de 13,52% do extrato é suficiente para total inibição do crescimento micelial (Figura 16). O óleo comercial Natuneem® também mostrou um melhor ajuste quadrático com o coeficiente de determinação de 93%, estimando melhor resposta na inibição do crescimento micelial nas concentrações entre 15 e 20% (Figura 17).

Figura 16 – Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.

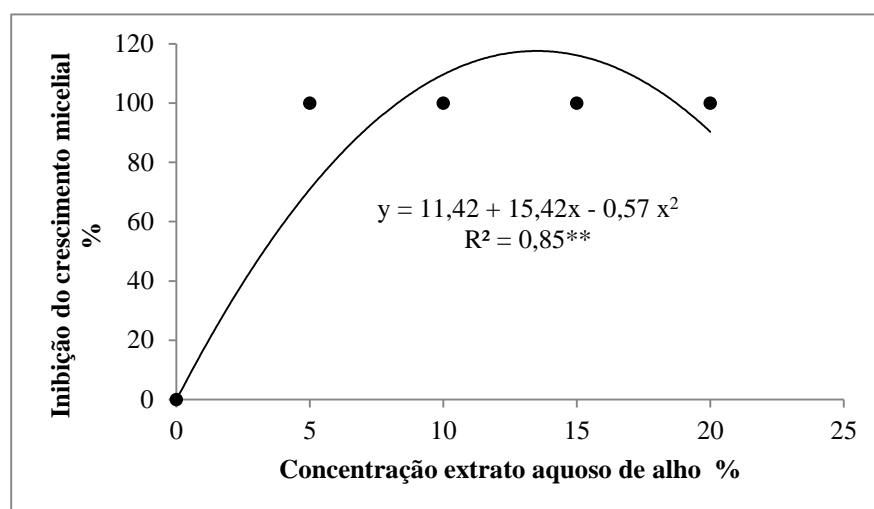
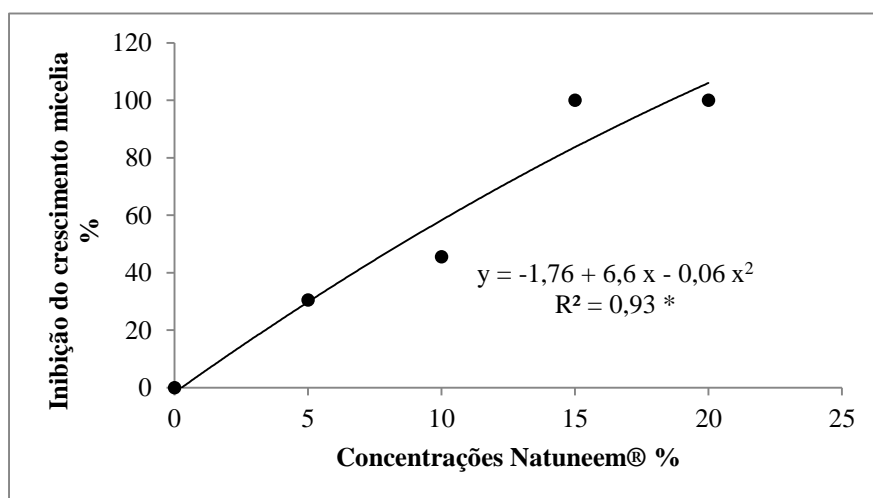


Figura 17 – Efeito de diferentes concentrações do óleo comercial Natuneem® na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.



No presente estudo, ficou evidente que as concentrações de extrato aquoso de alho são capazes de inibir totalmente o crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*. Possivelmente, a alicina, principal substância ativa do extrato de alho fresco, que é responsável pelo típico cheiro acre, seja responsável por tal feito. De acordo com Almeida; Suyenaga (2009), quando o alho é processado, ocorre à interação entre vários compostos, que por sua vez desencadeia reações químicas, como a formação do composto volátil alicina.

Segundo Slusarenko, Patel, Portz (2008), a alicina é a base da ação microbiana do alho e já se mostrou efetiva controlando queima das folhas de tomate e dos tubérculos de batata causada pelo oomiceto *Phytophthora*.

Souza; Araújo; Nascimento (2007), estudando os efeitos de concentrações de extrato de alho sobre crescimento micelial de *Fusarium proliferatum*, observaram efeito fungitóxico nas 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10,0%, contudo, destacaram maior eficiência na inibição micelial com 10%, ou seja, na maior concentração analisada do extrato. Venturoso et al. (2011), verificaram que concentrações de 10 e 20% do extrato aquoso de alho apresentaram resultados promissores no controle de *Phomopsis* sp., sendo que tais resultados corroboram, em partes, no que foi observado no presente estudo, visto que 5% do extrato inibiu 30,54% o crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*, sendo este promissor no controle do patógeno.

Os resultados obtidos demonstraram uma ação fungistática do óleo comercial Natuneem® sob o crescimento micelial de *P. cucurbitacearum*. Diversos trabalhos já foram notificados atestando o efeito do nim sobre fungos fitopatogênicos (CARNEIRO, 2003; CARNEIRO et al., 2007; GARCIA et al., 2012). A ação fungistática do óleo e do extrato de nim deve-se, possivelmente, à presença de substâncias bioativas, principalmente da azadiractina (DIAS-AIEIRA et al., 2010; SOLINO et al., 2012). Diniz et al. (2006), destacaram o óleo de nim como um produto promissor no controle do oomiceto *Phytophthora infestans*, agente causal da requeima do tomateiro, constatando a diminuição no progresso da doença.

4.3.3 Modo de ação dos produtos

Todos os produtos testados mostraram efeito fungitóxico, impedindo o desenvolvimento do patógeno. No entanto, o efeito fungicida foi observado apenas para os tratamentos de óleo essencial de hortelã e o indutor Ecolife®, nas maiores concentrações de 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; no extrato aquoso de alho, em todas as concentrações avaliadas; e no óleo comercial Natuneem®, nas concentrações de 15 e 20% (Tabela 6).

Possivelmente, a ação fungicida dos produtos alternativos pode ser atribuída à atuação direta sobre o patógeno, como na biossíntese de fosfolipídios e a deposição da parede celular, causando o rompimento e a morte celular. Segundo Bianchi et al. (1997), as alterações podem ser proveniente da atividade enzimática envolvida na formação da parede celular, provocando um desenvolvimento anormal do patógeno. Pesquisadores observaram colapso de hifas do oomiceto *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* utilizando extrato de alho na concentração de 10 mL.L^{-1} . Tais resultados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, visto que, todas as concentrações de alho testadas proporcionaram efeito fungicida, impossibilitando retomada do crescimento do patógeno.

De acordo com Soriano (2011), os princípios ativos presentes em extratos e óleos essenciais podem apresentar efeito fungicida, quando ocorre inviabilidade do micélio e

estruturas reprodutivas do patógeno; ou efeito fungistático, quando o crescimento micelial é apenas paralisado, podendo o patógeno voltar a se desenvolver caso o tratamento seja eliminado. O autor ainda concluiu que os óleos essenciais de citronela e o indutor Ecolife® não apresentaram efeito fungicida para o oomiceto *Phytophthora* sp., proporcionando apenas efeito fungistático, o que difere do modo de ação desses produtos no presente estudo para o isolado de *Pythium* sp.

Tabela 6 – Modo de ação dos produtos testados que apresentaram inibição total do crescimento micelial de *Pythium cucurbitacearum*.

| Produtos | Modo de ação | |
|--|--------------|--------------|
| | Fungicida | Fungistática |
| Óleo hortelã 1 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | | x |
| Óleo hortelã 2 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | x | |
| Óleo hortelã 4 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | x | |
| Óleo citronela 1 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | | x |
| Óleo citronela 2 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | | x |
| Óleo citronela 4 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | | x |
| Ecolife® 2 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | x | |
| Ecolife® 4 ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | x | |
| Extrato de alho 5% | x | |
| Extrato de alho 10% | x | |
| Extrato de alho 15% | x | |
| Extrato de alho 20% | x | |
| Natuneem® 15% | x | |
| Natuneem® 20% | x | |

4.4 CONCLUSÕES

- ✓ O óleo essencial de *M. piperita*, *C. nardus*, *E. globulus* e o indutor Ecolife® possui atividade fungistática, mostrando-se eficiente no controle *in vitro* de *P. cucurbitacearum*;
- ✓ O óleo essencial de hortelã e o indutor Ecolife® apresentam, de maneira semelhante, efeito fungicida sobre o patógeno, nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$;
- ✓ O extrato aquoso de alho na menor concentração testada de 5% (5 mg.mL^{-1}) proporciona efeito fungistático e fungicida sobre *P. cucurbitacearum*;
- ✓ O produto comercial Natuneem® proporciona efeito fungistático nas concentrações entre 10 e 20%, e ação fungicida nas concentrações de 15 e 20%.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.; SUYENAGA, E. S. Ação farmacológica do alho (*Allium sativum* L.) e da cebola (*Allium cepa* L.) sobre o sistema cardiovascular. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 1, p. 185-197, 2009.
- AMORIM, E. P. R. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, P. 392-398, 2011.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 63, de 23 de setembro de 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br/. Acesso em 04/08/2014.
- BENINI, P.C. et al. Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso em *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos Instituto Biológico**, v.77, n.4, p.677-83, 2010.
- BIANCHI, A. et al. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Disease**, v.81, n.11, p.1241-1246, 1997.
- BRITO, D. R. et al. Efeito dos óleos de citronela, eucalipto e composto citronelal sobre micoflora e desenvolvimento de plantas de milho. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, N. 4: p. 184-192, 2012.
- CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.
- CARNEIRO, S.M.T.P.G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.29, n. 3, p. 262-265, 2003.
- CARNELOSSI, P.R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.11, n.4, p. 399-406, 2009.

COSTA, A.R.T et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.13, n.2, p. 240-245, 2011.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p. 228-232, 2010.

DINIZ, L. P. et al. Avaliação de Produtos Alternativos para Controle da Requeima do Tomateiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, vol.31, n.2, p. 171-179, 2006.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62,p. 42-44, 1971.

FAO. Produção Mundial de mamão de 2012 . Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/. Atualizado em 07/02/2014. Acesso em 15/04/2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.6. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FURTADO, L. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.1,p.48-57, 2012.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.3, p. 439-445, 2012.

IBGE. Produção Agrícola Municipal de 2013. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/ Acesso em 10/06/2015.

MEISSNER FILHO, P. E. et al. Doenças. In: DANTAS, J. L. L.; JUNGHANS, D. T.; LIMA, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. Ed. Brasília, DF. Embrapa, 2013, p. 95-120.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, Recife: UFRPE, 2005, 398p.

MORAIS, L.A.S. Influencia dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050 – 4063, 2009.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO, H. P. Doenças do mamoeiro. In: SOUZA, J. da S.; RITZINGER, C. H. S. P. Mamão Fitossanidade. **Comunicação para Transferência de Tecnologia** - EMBRAPA, Brasília, v.11, p.37-46, 2000.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, N.2: p. 162-174, 2013.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.4, p.1267-71, 1999.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. UNOPAR **Cientia Ciência Biologia Saúde**, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

SALGADO, A.P.S.P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolares sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.2, p. 249-254, 2003.

SARMENTO-BRUM, R. B. C. et al. Effect of essential oils of medicinal plants on the anthracnose of sorghum, **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1549-1557, 2013.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.11, n.4, p. 442-449, 2009.

SEIXAS, P.T.L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.13, p. 513-517, 2011.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL A.; PORTZ, D., Control of plant diseases by natural products: allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, n.121: p.313-322. 2008.

SILVA, J. A. et al. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, pp. 611-616. 2009.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

SOLINO, A. J. S. et al. Severidade da antracnose e qualidade dos frutos de maracujá-amarelo tratados com produtos naturais em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 57-66, 2012.

SORIANO, W. T. **Avaliação de métodos alternativos no controle de *Phytophthora* sp em laranja pêra e limão cravo**. 2011. 68 f. Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção e Proteção Vegetal), Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, AL, 2011.

SOUZA, A. E.F.; ARAUJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p. 465-471, 2007.

VENTUROSOSO, L.M.A. et al. Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.89-95, 2011.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Óleo essencial de Eucalipto, Documentos Florestais n.17, Ed. USP: São Paulo, 2003.

5 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE A PODRIDÃO RADICULAR EM MUDAS DE MAMOEIRO OCACIONADA POR *Pythium cucurbitacearum*, E ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS A DEFESA VEGETAL

RESUMO

Os produtos alternativos surgem como uma estratégia de controle que já vêm sendo aferidos para diversos fitopatógenos com êxito. Tais produtos, incluindo os indutores de resistência, além de atuar diretamente no desenvolvimento do patógeno, podem agir também na ativação do sistema de defesa natural da planta. Desse modo, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do Ecolife[®], do ácido LD β-amino-n-butírico (BABA), extrato de alho (*Allium sativum* L.) e óleos essenciais na redução da podridão do colo e de raízes em mudas de mamoeiro *Carica papaya* L. Foram realizados dois ensaios experimentais, sendo que, no primeiro, mudas de mamoeiro aos 45 dias de idade foram inoculadas com *Pythium cucurbitacearum*, e após 48 horas receberam tratamento com óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), e indutor Ecolife[®] na concentração de 2 µL.mL⁻¹, extrato de alho a 5% (5 mg.mL⁻¹), e testemunha tratada apenas com Água Destilada Esterilizada (ADE). Decorridos 15 dias, foram feitas avaliações com relação à presença de sintomas. No segundo ensaio experimental, mudas com 60 dias de idade, receberam tratamento com indutor BABA na concentração de 300 µg.mL⁻¹, óleo essencial de hortelã-pimenta e o indutor Ecolife[®] na concentração de 2 µL.mL⁻¹. As mudas foram inoculadas 24 horas após tratadas, e a quantificação da atividade das enzimas Peroxidases (POX) e Fenilalanina Amonia-Liase (FAL), relacionadas com as respostas de defesa vegetal, foram realizadas após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dos produtos alternativos testados, apenas o óleo essencial de hortelã-pimenta e o indutor Ecolife[®] apresentaram controle sobre a podridão das raízes em mamoeiro causada por *P. cucurbitacearum*. De acordo com a quantificação de enzimas, apenas o óleo essencial de hortelã-pimenta mostrou incremento na atividade de POX, apresentando pico enzimático nas folhas coletadas após 72 horas da inoculação. Para a atividade da FAL, foi observado aumento da atividade da enzima nas folhas coletadas 24 horas após a inoculação das plantas tratadas apenas com Água destilada esterilizada (ADE) e com o indutor Ecolife[®]. Incremento significativo da enzima também foi observado 96 horas após a inoculação nas plantas pulverizadas com o indutor BABA.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Atividade enzimática. Controle alternativo.

EVALUATION OF ALTERNATIVE PRODUCTS ON THE ROOT ROT IN SEEDLINGS PAPAYA ARISING IN *Pythium cucurbitacearum*, AND ACTIVITY OF ENZYMES RELATED TO DEFENSE VEGETABLE

ABSTRACT

Alternative products arise as a strategy of control that have already been measured for various pathogens successfully. Such products, including resistance inducers, besides acting directly in the development of the pathogen, can act also in the activation of the plant's natural defense system. Thus, this study aimed to evaluate the Ecolife[®], acid LD β -amino-n-butírico (BABA), garlic extract (*Allium sativum* L.) and essential oils in reducing stem rot and root in papaya *Carica papaya* L. Two experimental assays were performed, and at first, papaya seedlings at 45 days of age were inoculated with *Pythium cucurbitacearum*.; and after 48 hours were treated with essential oils of peppermint (*Mentha piperita* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* L.) and inductor Ecolife[®] at a concentration of 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, garlic extract of 5% (5 mg.mL^{-1}), and control treated with Sterilized Distilled Water (SDW). After 15 days, evaluations were made for the presence of symptoms. In the second experimental test, plants 60 days old were treated with inductor BABA at a concentration of 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, essential oil of peppermint and inductor Ecolife[®] in concentration 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The seedlings were inoculated 24 hours after treated, and the quantification of enzymes activity Peroxidases (POX) and Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL), related to plant defense responses, were performed after 24, 48, 72 and 96 hours of inoculation. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey test at 5% probability. Among alternative products tested, only the essential oil of peppermint and inductor Ecolife[®] they had control of root rot in papaya caused by *P. cucurbitacearum*. According to the quantification of enzymes, only the essential oil of peppermint showed increase in activity POX, with enzymatic peak in leaves collected after 72 hours of inoculation. To the activity of PAL was observed increased enzyme activity in leaves collected 24 hours after inoculation of the plants treated only with SDW and the inductor Ecolife[®]. Significant increase of the enzyme was also observed 96 hours after inoculation in the plants with the inductor BABA.

Keywords: Essential oils. Enzyme activity. Alternative control.

5.1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma cultura de grande importância econômica que encontra-se distribuído em todas as regiões do Brasil, entretanto, a maior produção encontra-se na região Nordeste com uma produção de 978.140 toneladas (IBGE, 2014). Os frutos do mamoeiro são consumidos, principalmente, na forma 'in natura' e deles também é extraída a papaína, uma enzima proteolítica de ampla utilização para os mais variados fins nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos.

A cultura do mamoeiro pode ser atingida por diversas doenças, destacando-se a podridão das raízes e do colo, que pode acarretar perdas consideráveis à cultura, sobretudo em plantas jovens ainda no viveiro. A sintomatologia da doença pode ser ocasionada por diversos patógenos, como *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. e *Pythium* sp. (MEISSNER FILHO et al., 2013; OLIVEIRA, 2000).

O controle do tombamento, da podridão do colo e raízes do mamoeiro, causados por *Pythium* sp., é realizado mediante a utilização de fungicidas. Entretanto, uma das desvantagens da utilização desses fungicidas, quando aplicados continuamente, é a ocorrência da resistência do patógeno (MICHEREFF; ANDRADE; PERUCH, 2005), além de constituir sérios riscos ao ambiente e à saúde humana, principalmente pela presença de resíduos tóxicos.

Desse modo, métodos alternativos, mediante o uso de indutores abióticos e produtos naturais, tais como, extratos vegetais e óleos essenciais, vêm sendo frequentemente testados, com objetivo de não apenas controlar fitopatógenos, mas também de ativar mecanismos de defesa natural das plantas tratadas (RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006); (RESENDE et al., 2007).

A atividade enzimática tem efeitos expressivos na resistência à infecção, com redução significativa do ataque de patógenos. Indutores de resistência bióticos e abióticos são utilizados na defesa de plantas a patógeno, e acréscimos nas atividades das enzimas Peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (FAL) têm sido demonstrados durante o processo de indução de resistência (CAMPOS et al., 2004; RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006; SILVA, 2007; ALAMINO et al., 2013).

O ácido LD β -amino-n-butírico (BABA), da Sigma Chemical, vem sendo estudado e tem demonstrado possuir efeito protetor contra alguns patógenos (ALTAMIRANDA et al., 2008; (LUNA et al., 2014).

Informações têm demonstrado que o Ecolife[®], extrato obtido de biomassa cítrica, composto por bioflavonoides, além de melhorar a resistência das plantas ao “stress”, tem sido utilizado com êxito como ativador de resistência a doenças causadas por bactérias e fungos (CAVALCANTI, 2006; FURTADO et al., 2010).

Lucas (2012) constatou que o óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* DC Stapf) induziu o controle da pinta preta do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.), aumentando a atividade de enzimas de defesa. Em estudos realizados por Silva (2007), o extrato de alho (*Allium sativum* L.) e óleo de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) induziu a resistência em mudas de bananeira (*Musa* spp. L.), reduzindo a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do uso dos indutores BABA e Ecolife[®]; extrato de alho e óleos essenciais de hortelã-pimenta, citronela e eucaliptos na redução da podridão do colo e de raízes em mudas de mamoeiro e quantificar a atividade de enzimas relacionadas a defesa vegetal.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia, Fisiologia Vegetal e na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia (BIOVEG) do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em Rio Largo-AL (9° 27'57" de latitude Sul, 34° 50'1" de longitude Oeste e 127 m de altitude).

5.2.2 Avaliação *in vivo* de produtos alternativos no controle da podridão do colo e das raízes, causada por *Pythium cucurbitacearum*

As mudas de mamoeiro foram plantadas em bandejas contendo 54 tubetes com capacidade para 288 cm³ de substrato, preenchidas com mistura de 50% de Plantmax floresta (Eucatex, Brasil) e 50% de solo esterilizado. Foram plantadas três sementes por tubete a, aproximadamente, 1 cm de profundidade. Após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma muda por tubete.

Foram avaliadas as concentrações que apresentaram melhor efeito fungitóxico dos ensaios *in vitro*. Mudas de mamoeiro aos 45 dias após a semeadura foram inoculadas. As plantas tiveram seu sistema radicular imerso, por 20 minutos, em uma suspensão homogeneizada em liquidificador, composta por micélio, numa proporção de uma placa de Petri

em 200 mL de Água Destilada Esterilizada (ADE) conforme Carnáuba (2006). Posteriormente, foram transplantadas para copos descartáveis com capacidade de 400 mL e colocadas, por 48 horas, em bandejas com nível de água, aproximadamente, 2 cm. Após 48 horas da inoculação, receberam pulverização via folia com os seguintes produtos: óleos essenciais de eucalipto, hortelã-pimenta, citronela e indutor Ecolife[®] na concentração de 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; extrato de alho a 5% (5 mg.mL^{-1}) e testemunha apenas com ADE. Decorridos 15 dias, foram realizadas avaliações com relação à presença de sintomas, tais como: murcha, amarelecimento e tombamento.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição composta por quatro plantas, em cada tratamento. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2010).

5.2.3 Avaliação dos produtos alternativos sobre a atividade de enzimas relacionadas com indução de resistência em folhas de mamoeiro

Os produtos que apresentaram melhor efeito de controle do ensaio *in vivo* foram avaliados. O efeito de não indução de resistência foi avaliado em plantas tratadas apenas com água e a resposta positiva de indução foi verificada com aplicação do indutor de resistência BABA (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Mudas de mamoeiro aos 60 dias de idade receberam tratamentos com óleos essenciais de hortelã-pimenta e indutor Ecolife[®], na concentração de 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; BABA (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e testemunha inoculada com *P. cucurbitacearum*. e tratada apenas com ADE. Após 24 horas de tratadas, as mudas foram inoculadas utilizando-se 30 mL em cada planta de uma suspensão homogeneizada em liquidificador composta por micélio, conforme metodologia descrita no experimento anterior.

Para a realização das análises bioquímicas, foram coletadas folhas de mamoeiro das plantas de cada tratamento, às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas em tubos falcon e armazenadas em freezer vertical (-86°C), para posterior análise.

5.2.3.1 Obtenção do extrato proteico

As amostras de folhas de mamoeiro (0,5g) coletadas conforme descrito acima, foram homogeneizadas mecanicamente em 5 mL de tampão de acetato de sódio 100mM (pH 5,0), com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana até a obtenção de massa homogênea, que foi

centrifugada à 15.000 g durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade de POX, FAL e quantificação de proteínas.

5.2.3.2 Determinação da atividade de Peroxidase (POX)

A atividade de POX foi determinada a partir de 200 µL do extrato proteico e 2,8 mL de uma solução preparada a partir de: 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, o qual foi substituído por água. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, a aproximadamente 25°C e expressa em unidade de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹ (KUHN; PASCHOLATI, 2010). A atividade foi medida durante três minutos em intervalo de 15 segundos.

5.2.3.3 Determinação da atividade de fenilalanina-amônia liase (FAL)

A atividade da enzima FAL foi avaliada com 200 µL do extrato enzimático, 1500 µL de Tris 100 mM, 500 µL de Fenilalanina (substrato) e 800 µL de ADE. Os tubos de ensaio contendo as reações foram mantidos em banho-maria à 40°C por 60 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido clorídrico a 5,0 M. No ensaio foram realizadas duas reações de referência. A primeira constando apenas o substrato (Branco 1) e a segunda contendo o extrato proteico (Branco 2). O Branco 1 foi preparado adicionando-se 1500 µL de Tris HCl 100 mM (pH 8,8), 500 µL de Fenilalanina 30 mM e 1000 µL de ADE. O Branco 2 consistiu de 1500 µL de Tris 100 mM, 200 µL do extrato enzimático e 1300 µL de ADE. A leitura foi realizada em cubeta de quartzo, por meio de variação na absorbância em comprimento de onda de 290 nm, a 25°C e expressa em unidade de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹ (UMESHA, 2006).

5.2.3.4 Quantificação de proteínas

O teste de Bradford foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras (BRADFORD, 1976). Em 20 µL do sobrenadante adicionou-se 1 mL de reagente concentrado de Bradford, e, após 15 minutos, procedeu-se a leitura de absorbância a 595 nm.

As leituras da absorbância foram realizadas no espectrofotômetro (GENESYS™ 10S UV-Vis) e as reações para cada planta tratada foram realizadas em triplicatas para cada repetição. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x4), sendo quatro tratamentos (ADE, Ecolife®, óleo essencial de hortelã-pimenta e

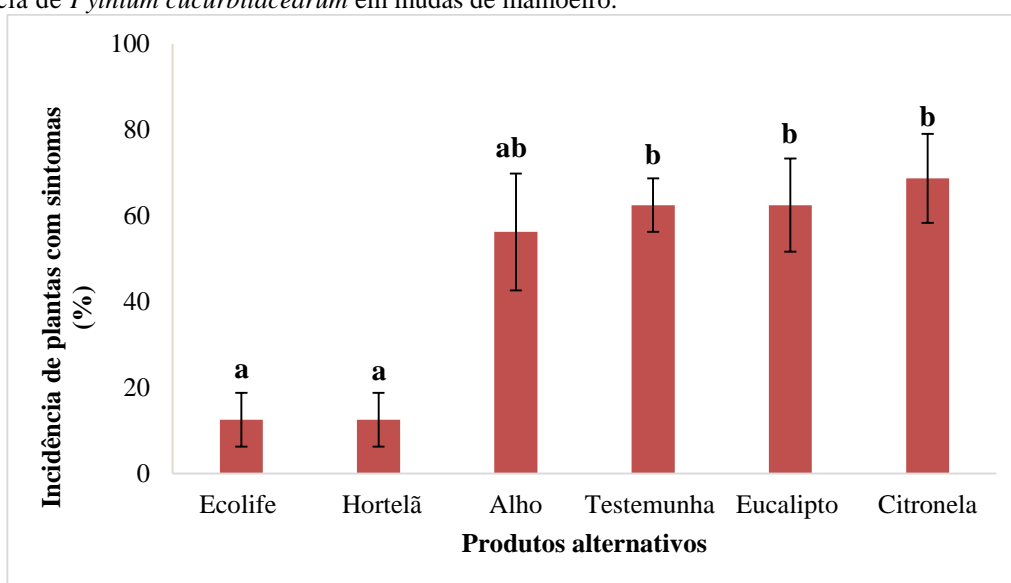
BABA) em quatro tempos (24, 48, 72 e 96 horas). As análises estatísticas foram realizadas com os valores calculados de atividade enzimática. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, através do programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2010).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Incidência da doença

As mudas de mamoeiro tratadas com o produto Ecolife® e o óleo essencial de hortelã-pimenta mostraram diminuição na incidência da podridão das raízes causada por *P. cucurbitacearum* em 50%, quando comparada com a testemunha e com as plantas tratadas com o óleo essencial de eucalipto; e uma diminuição acima de 55% em relação ao óleo essencial de citronela (Figura 19). Tais resultados, condizem com os efeitos desses produtos no controle *in vitro*, visto que, o Ecolife® e o óleo essencial de hortelã-pimenta apresentaram de maneira semelhante, além da atividade fungistática, um efeito fungicida. Entretanto, o extrato aquoso de alho, e o óleo essencial de eucalipto, apesar do sucesso no controle *in vitro*, não apresentou um efeito com relação ao controle, pois, as plantas tratadas com esses produtos apresentaram incidência de mais de 50% da doença.

Figura 18 – Efeito de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.); citronela (*Cymbopogon nardus* L.); eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.); indutor Ecolife® e extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.), sobre a incidência de *Pythium cucurbitacearum* em mudas de mamoeiro.



¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autora (2015).

Possivelmente, o sucesso da ação dos produtos alternativos no controle de doenças de plantas depende de suas propriedades biológicas. Os óleos essenciais possuem propriedades, cujo efeitos biológicos podem ser resultado de um sinergismo de todas as moléculas ou de compostos majoritários presentes (BAKKALI et al. 2008). No caso do óleo essencial de hortelã-pimenta, Singh; Shushni; Belkheir (2011) destacaram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo associada ao mentol e a mentona, seus componentes majoritários. É provável que esses elementos tenham sido responsáveis pelo controle da podridão das raízes do mamoeiro causada por *P. cucurbitacearum*.

Óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas, têm mostrado sua efetividade no controle de doenças em alguns patossistemas. Segundo Maia et al. (2014), a mancha da folha causada pelo míldio da videira pode ser controlada pelo óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Vitoratos et al. (2013), comprovaram a eficiência de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) e limão (*Citrus limon* L.) no controle de *Botrytis cinerea* em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e morango (*Fragaria vesca* L.). Sarmento-Brum et al. (2013) observaram a eficiência dos óleos de capim-limão, citronela, erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), hortelã-pimenta e nim (*Azadirachta indica*) na redução da severidade da antracnose do sorgo.

De acordo com Cruz et al. (2011), o produto Ecolife[®], apresenta, na sua constituição, compostos biologicamente ativos, podendo exercer também ação sobre o patógeno. O produto possui ainda em sua composição, bioflavonoides cítricos, ácido ascórbico e fitoalexinas cítricas capazes de exercer efeito protetor e/ou curativo em alguns patossistemas.

A ineficácia do extrato de alho no controle da podridão das raízes do mamoeiro, nas condições *in vivo*, pode estar relacionada com a volatilidade da alicina, substância antimicrobiana produzida quando o alho é macerado, e também pela relação do patossistema estudado, podendo haver degradação dos compostos pelas condições ambientais de luz, temperatura, entre outros. Em trabalho realizado anteriormente, em condições *in vitro*, o extrato de alho mostrou sucesso na inibição do crescimento micelial do patógeno, provavelmente, pelo fato de estar em contato direto e confinados em placas de Petri.

Os resultados do presente estudo diferem dos encontrados por Nashwa; Elyousr (2012), os quais observaram que extratos de *A. sativum*, na concentração de 5%, reduziu significativamente a doença pinta-preta em tomateiro (*Alternaria* sp.) em condições de campo.

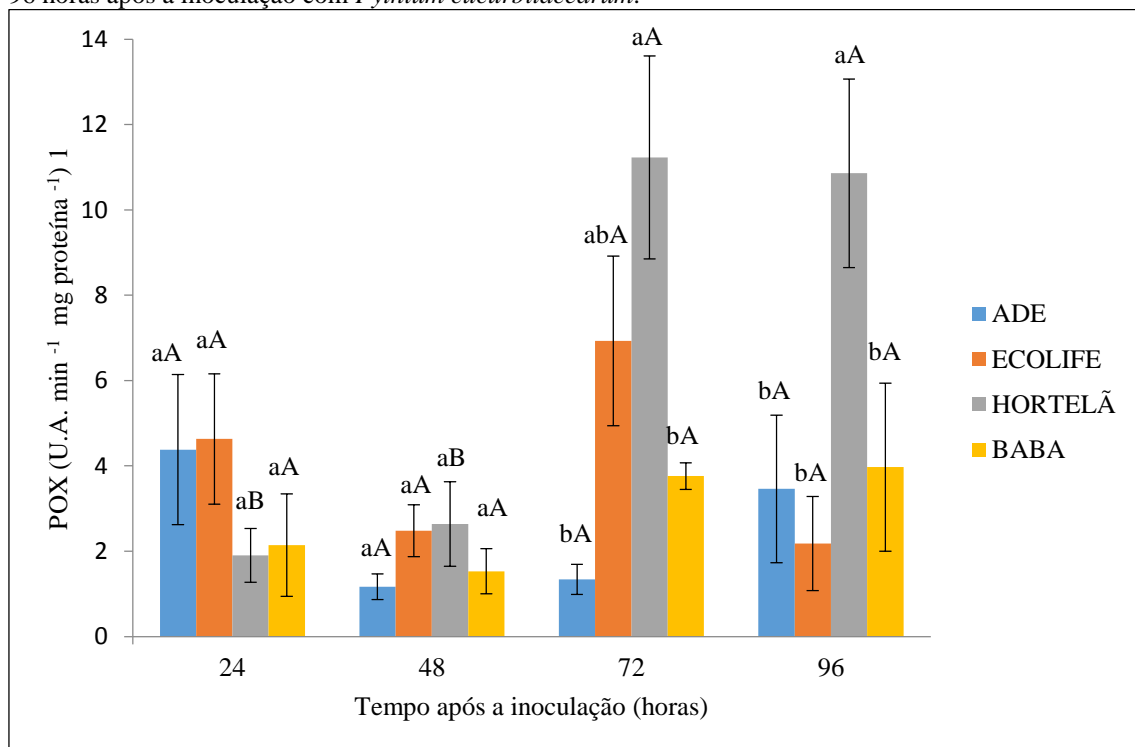
Alguns estudos têm apontado o sucesso do uso do extrato de alho em conjunto com óleo vegetal em condições de campo. De acordo com Leite et al. (2012), o extrato bruto de alho associado a óleo vegetal foi efetivo no controle da antracnose da videira em condições de

campo. Segundo Leite et al. (2011), o extrato de alho também associado ao óleo vegetal apresentaram grande potencial de utilização no controle do oomiceto causador do míldio da videira (*Plasmopara viticola*).

5.3.2 Atividade enzimática

A aplicação dos indutores Ecolife® e BABA não proporcionou incrementos significativos na atividade de peroxidase, no período analisado de 24 a 96 horas após a inoculação com *P. cucurbitacearum*, quando comparado as plantas que foram tratadas apenas com ADE. Entretanto, as plantas que foram tratadas com óleo essencial de hortelã-pimenta apresentaram incremento da enzima após 72 horas da inoculação e se mantiveram até 96 horas, sendo o incremento da enzima superior em até nove vezes, quando comparado às plantas do tratamento testemunha (Figura 19).

Figura 19 - Atividade de peroxidase (POX) em folhas de mamoeiros induzidas com ácido LD β-amino-n-butírico (BABA), Ecolife®, Óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com *Pythium cucurbitacearum*.



¹Médias seguidas pelas letras minúsculas iguais entre produtos diferentes no mesmo tempo de inoculação não diferem entre si, e letras maiúsculas iguais entre os mesmos produtos em tempos de inoculação diferentes não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão. Fonte: Autora (2015).

A atividade da POX têm sido frequentemente relacionadas à resposta de resistência em diferentes patossistemas e em diversos estudos. Segundo Cavalcanti et al. (2006), a resistência

induzida foi evidenciada pelo aumento da atividade de POX em tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*); sendo o mesmo observado por Araújo; Menezes (2009), em doenças foliares do tomateiro.

De acordo com Campos et al. (2004), maiores estímulos na atividade enzimática da peroxidase foi observada em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com maior resistência contra a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*).

O aumento significativo da peroxidase nas plantas pulverizadas com óleo essencial de hortelã-pimenta, cuja coleta das folhas ocorreu as 72 e 96 horas após a inoculação, pode ser um indicativo de indução sistêmica desencadeada pela ação dos componentes presentes no óleo essencial nesse período. Desse modo, é possível que tenha ocorrido uma volatilização mais lenta do óleo.

Os óleos essenciais vêm mostrando respostas consideráveis na ativação de enzimas relacionadas a defesa. Pereira et al. (2008), estudando produtos alternativos e indutor de resistência no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro (*Cercospora coffeicola*), observaram que o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) aumentou a atividade de peroxidase. Segundo Pereira et al. (2012), o óleo essencial de citronela proporcionou aumento na atividade de peroxidase, ativando respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e cercosporiose (*C. coffeicola*). O óleo essencial de capim-limão também proporcionou potencial de indução de resistência em plantas de tomate contra *Alternaria solani* (ITAKO; TOLENTINO JR; SCHWAN-ESTRADA, 2013).

Possivelmente, a menor incidência da podridão radicular causada por *P. cucurbitacearum* nas mudas de mamoeiro observadas no experimento anterior, onde as plantas foram tratadas, após a inoculação, com o óleo essencial de hortelã-pimenta, pode estar relacionada tanto com a ação direta dos produtos sobre o patógeno, quanto pela ativação da POX, enzima relacionada a defesa; o que não ocorreu com o indutor Ecolife[®], o que indica um resultado apenas da ação direta do produto sobre o patógeno.

Tavares et al., (2009) observaram incremento na atividade de peroxidase em plantas de mamoeiro, constatando a indução de resistência à podridão radicular causada pelo oomiceto *Phytophthora palmivora* com o uso de indutores bióticos e abióticos.

De acordo com Cavalcanti et al. (2007), as peroxidases estão envolvidas em diversos processos fisiológicos das plantas, tais como a lignificação da parede celular, regulação e crescimento, biossíntese de etileno e respostas a vários estresses.

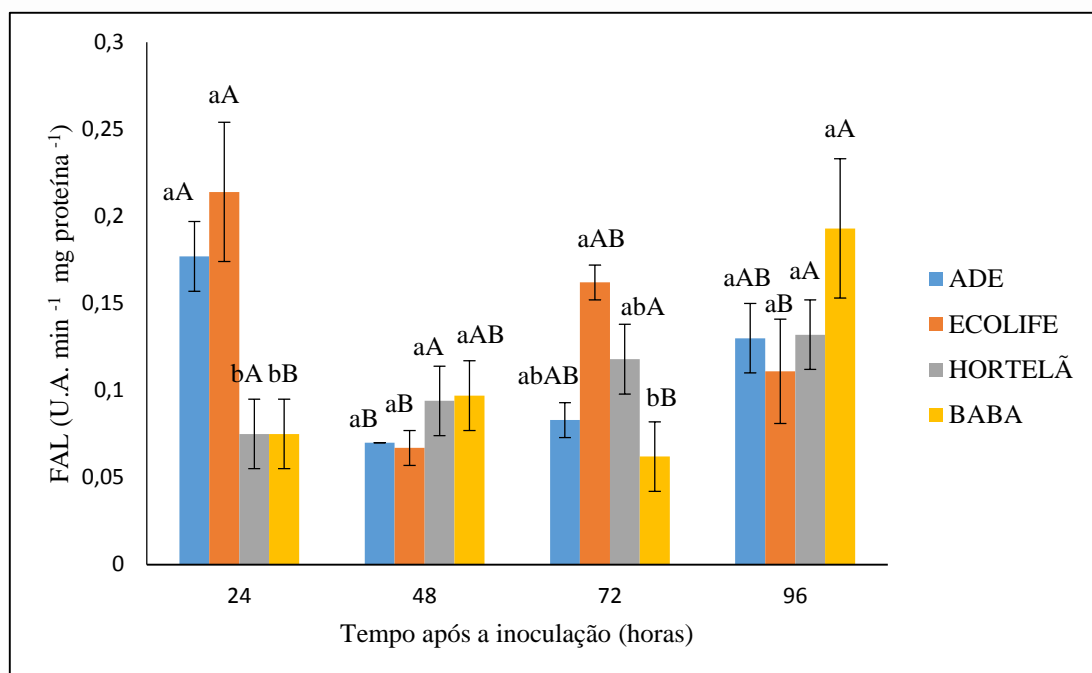
Para a atividade de FAL, às 24 horas após a inoculação com o patógeno, houve um aumento significativo da atividade da enzima nas plantas que foram tratadas apenas com ADE

e com o indutor Ecolife[®], sendo superior à atividade das plantas tratadas com óleo essencial de hortelã-pimenta.

Entretanto, após 48 horas da inoculação, as plantas induzidas com os produtos não apresentaram diferenças significativas na atividade da enzima, ocorrendo uma diminuição da atividade nesse tempo para as plantas tratadas com ADE e Ecolife[®], em relação as primeiras 24 horas.

Após 72 horas, as plantas que foram tratadas com Ecolife[®] apresentaram maior incremento da enzima em relação aos demais tratamentos. Contudo, 96 horas após a inoculação, o indutor BABA proporcionou um aumento significativo na atividade da FAL em relação às plantas tratadas com o mesmo produto às 24, 48 e 72 horas (Figura 20).

Figura 20 - Atividade de Fenilalanina-Amônia Liase (FAL) em folhas de mamoeiros induzidas com, ácido LD β-amino-n-bútrico (BABA), Ecolife[®], óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), e testemunha (ADE), às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação com *Pythium cucurbitacearum*.



¹Médias seguidas pelas letras minúsculas iguais entre produtos diferentes no mesmo tempo de inoculação não diferem entre si, e letras maiúsculas iguais entre os mesmos produtos em tempos de inoculação diferentes não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autora (2015).

Provavelmente, o aumento da atividade da FAL nas plantas testemunha, inoculadas apenas com o patógeno e tratadas com ADE, 24 horas após a inoculação, pode estar relacionado ao estímulo da presença do patógeno na planta, ou seja, a resposta de defesa da própria planta contra a ação do patógeno. De acordo com Itako; Tolentino Jr; Schwan-Estrada (2013), as

enzimas relacionadas com a patogênese geralmente têm participação nos mecanismos de defesa durante a infecção.

Entretanto, para as plantas cujas folhas foram pulverizadas com o indutor BABA, a atividade da FAL teve seu aumento máximo 96 horas após a inoculação com o patógeno. Mostrando o possível efeito do indutor nesse período, Baysal et al. (2005), observaram indução da resistência em folhas de tomate induzidas por BABA contra o cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis*, relatando o aumento da FAL. De acordo com Jakab et al. (2001), o efeito protetor do BABA é devido a uma potencialização dos mecanismos de defesa natural contra estresses bióticos e abióticos.

De acordo com Stangarlin et al. (2011), a FAL é uma enzima responsável pela conversão de L-fenilalanina em ácido *trans-cinâmico*, que é importante para a produção de fenilpropanoides, como a lignina, e flavonoides, como as fitoalexinas. Dessa maneira, o aumento de FAL está frequentemente associado ao aumento da concentração dessas substâncias, que são importantes no mecanismo de defesa das plantas ao ataque de patógenos.

5.4 CONCLUSÕES

- ✓ O óleo essencial de hortelã-pimenta e o indutor Ecolife® são capazes de controlar a podridão de raízes causado por *P. cucurbitacearum*, em mudas de mamoeiro;
- ✓ O extrato aquoso de alho e o óleo essencial de eucalipto não apresentam efeito de controle da podridão de raízes causado por *P. cucurbitacearum*, em mudas de mamoeiro;
- ✓ O óleo essencial de hortelã-pimenta proporciona aumento na atividade da POX, contudo, o mesmo não ocorre com a atividade da FAL.

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANDA, E. A. G. et al. Effect of b-aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. **Australasian Plant Pathology**, v.37, p.421-427, 2008.

ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p.169-172, 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAYSAL, O. Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-b-amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **European Journal of Plant Pathology**, v.112, p.361-369, 2005.

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

CAMPOS, A.D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p.637-643, 2004.

CARNAUBA, J. P. **Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora palmivora* em plântulas de mamoeiro CV. Sunrise solo**. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2006.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas versicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p. 372-380, 2006.

CAVALCANTI, F.R. et al. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosus* mycelium activates tomato defence response against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, p. 729-738, 2007.

CRUZ, S. M. DA C. et al. Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. **IDESIA**, v.29, n.2, p.111-118, 2011.

FAO. Produção Mundial de mamão de 2012. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/. Atualizado em 07/02/2014. Acesso em 15/04/2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.6. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FURTADO, L. M. et al. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

IBGE. Produção Agrícola Municipal de 2013. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/ Acesso em 10/06/2015.

ITAKO, A.T.; Tolentino Júnior, J.B; Schwan-Estrada, K.R.F.; *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. **IDESIA**, v 31, n 4, p.11-17, 2013.

JAKAB G. et al. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**. v.07, p.29-37, 2001.

KUHN, O.J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 27, n.1, p.13-20, 2006.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p. 107-114, 2010.

LEITE, C. D. et al. Extrato de alho e óleo vegetal no controle do míldio da videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.2, p. 429-436, 2011.

LEITE, C.D. et al. Extrato de alho no controle *in vitro* e *in vivo* da antracnose da videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.3, p. 556-562, 2012.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 92 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
LUNA E. et al. Role of NPR1 and KYP in long-lasting induced resistance by β -aminobutyric acid. **Frontiers Plant Science**, v. 5, 2014.

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

MAIA, A. J. et al. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.5, p. 330-339, 2014.

MEISSNER FILHO, P. E. et al. Doenças. In: Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. **Mamão - O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013, p. 95-120.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, Recife: UFRPE, 2005, 398p.

NASHWA, S.M.A.; ABO-ELYOUSR, K.A.M. Evaluation of various extracts against the early blight diseases of tomato plants under greenhouse and field conditions. **Plant Protect. Sci.** v. 48, n. 2, p. 74-79, 2012.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. **Mamão Fitossanidade**. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.11, 2000. p.37-46, 2000.

PEREIRA, R. B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia**, n.4, v.36, p. 383-390, 2012.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1287-1296, 2008.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.3, p. 213-221, 2007.

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S.B. Indução de Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.

SARMENTO-BRUM, R. B. C. et al. Effect of essential oils of medicinal plants on the anthracnose of sorghum, **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1549-1557, 2013.

SILVA C. L. et al. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 632-638, 2012.

SILVA, J. C. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal do Panamá da bananeira**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2007.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; Belkheir, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n.1, p. 18-46, 2011.

TAVARES, G. M. **Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e Trichoderma e avaliação dos mecanismos de defesa envolvidos**. 2009. / 113 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia, Recife, 2009.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica** 34:6 8-71. 2006.

VITORATOS, A. et al. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic**, v. 41, n. 1, p. 86- 92, 2013.