



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

SILMARA RODRIGUES PIETROBELLI

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES CITRÍCAS NO CONTROLE DA FERRUGEM
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) DA SOJA (*Glycine
max* (L.) (Merrill))**

LARANJEIRAS DO SUL, PR

2017

SILMARA RODRIGUES PIETROBELLI

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES CITRÍCAS NO CONTROLE DA FERRUGEM
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) DA SOJA (*Glycine
max* (L.) (Merrill))**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de título de
Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul.

Orientador: Dr. Gilmar Franzener

LARANJEIRAS DO SUL, PR

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Pietrobelli, Silmara Rodrigues
ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES CITRÍCAS NO CONTROLE DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P.
Sydow) DA SOJA (*Glycine max* (L.) (Merrill)/ Silmara
Rodrigues Pietrobelli. -- 2017.
45 f.:il.

Orientador: Gilmar Franzener.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia com linha de formação em agroecologia ,
Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Atividade Antifúngica. 2. Controle Alternativo. 3.
Proteção de Plantas. I. Franzener, Gilmar, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

SILMARA RODRIGUES PIETROBELLI

ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES CITRÍCAS NO CONTROLE DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) DA SOJA
(*Glycine Max* (L.) (Merril))

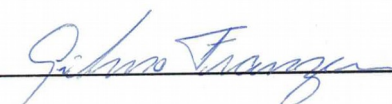
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul (PR).

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener


Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

16 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gilmar Franzener- UFFS



Engenheiro Agrônomo Edemar José Baranek- UFFS



Prof. Dr. Gabriela Silva Moura- UFFS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder o dom da vida.

Aos meus pais Itelvino Pietrobelli e Francisca Rodrigues, e a minha irmã Simone Pietrobelli, por todo apoio concedido nesses anos de vida acadêmica, pela paciência nos momentos críticos, pelo amor, carinho e confiança a mim depositada, e principalmente por nunca me deixarem desistir ao longo do caminho. Por não medirem esforços pra me manter na Universidade e por dividirem comigo a satisfação de dever cumprido.

Aos professores que durante a graduação de alguma forma contribuíram para minha formação profissional.

Aos meus colegas, que presenciaram as crises, os momentos difíceis e sempre tiveram palavras confortantes e gentis. E também a todos que colaboraram na execução prática do projeto.

Em especial também a Gabriela Silva Moura por todo apoio, ajuda, pelas palavras ditas na hora certa e pelos ensinamentos repassados, pela confiança e por sempre acreditar que eu era capaz.

Ao meu orientador Gilmar Franzener, pela disponibilidade, paciência, e conselhos que me ajudaram não só a crescer como profissional, mas como pessoa.

RESUMO

A soja chegou ao Brasil em 1882, e logo se expandiu por todo o país. Com o passar dos anos diversas doenças de impacto no desenvolvimento e na produtividade da cultura foram se estabelecendo. Dentre as principais está a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), que é de rápida disseminação e pode causar severos danos. Atualmente seu controle é feito com aplicações de fungicidas, o que pode causar impactos ao meio ambiente, na saúde do produtor e no equilíbrio dos ecossistemas. Nesse sentido objetivou-se, nesse trabalho, avaliar o potencial do óleo essencial (OE) de quatro espécies cítricas (*Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus vulgaris* e *Citrus paradisi*), para controle alternativo dessa doença. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Laranjeiras do Sul-Pr. A avaliação da germinação de esporos foi realizada em lâminas de microscopia contendo uma camada delgada de ágar-água 1%, sobre a qual foram depositados 30 µL da suspensão de esporos e 30µL de cada tratamento. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida a 23°C por 12 horas quando foi determinada a porcentagem de germinação. Constituíram tratamentos as concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2% de cada óleo essencial, além da testemunha sendo água destilada contendo 0,1% de Tween 20. O bioensaio de indução das enzimas de defesa foi conduzido em plantas de soja em casa de vegetação. Os OE foram aplicados no primeiro trifólio de cada planta e após 72 horas foram coletados cinco discos de 1,5 cm de diâmetro, do primeiro trifólio (tratado) bem como do segundo trifólio (não tratado) de cada planta para análise de carboidratos, proteínas, peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase. O bioensaio para verificação da severidade da doença foi conduzido em plantas de soja em casa de vegetação. Foram aplicados no primeiro trifólio de cada planta os tratamentos constituídos das quatro espécies cítricas nas concentrações de 0,1 e 0,5 % com cinco repetições. Após dez dias foi avaliada a severidade da doença com a escala diagramática. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Todos os OE das diferentes espécies cítricas inibiram significativamente a germinação de esporos, com destaque para *C. vulgaris* que a 0,1% já promoveu inibição total. Os OE promoveram incremento na atividade das enzimas já na concentração de 0,1%. Maior indução foi observada em trifólios tratados, indicando efeito local. Para a severidade os trifólios tratados com as espécies *C. reticulata* e *C. vulgaris* nas concentrações de 0,1 e 0,5% não apresentaram potencial de óleo essencial das espécies cítricas testadas para o controle de ferrugem asiática na cultura da soja.

Palavras chaves: Controle alternativo. Proteção de plantas. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Soybeans arrived in Brazil via the United States in 1882, and soon expanded throughout the country. Over the years several diseases of high impact in the development and productivity of the culture were established. Among the main ones is the Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*), which is fast-spreading and which in the last few seasons is caused by high levels of loss and severe damage. Currently its control is made with numerous applications of fungicides, causing what can cause several impacts to the environment, the health of the producer and the balance of ecosystems. In this sense, the objective of this work was to determine the efficiency of the evaluation of the essential oil potential (EO) of four citrus species (*Citrus sinensis*), (*Citrus reticulata*), (*Citrus vulgaris*) and (*Citrus paradisi*), verifying if its application can be used as an alternative Control of this disease. The work was carried out in the Phytopathology Laboratory and in the greenhouse of the Federal University of the Southern Border, Laranjeiras do Sul-PR. The evaluation of spore germination was performed on microscopic slides containing a 1% agar-water thin layer, on which 30 μ L of the spore suspension and 30 μ L of each treatment were deposited. These slides were incubated in a humid chamber at 23 ° C for 12 hours when the percentage of germination was determined. Concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2% of each essential oil were used, in addition to the control being distilled water containing 0.1% Tween 20 with five replicates. The induction bioassay of the defense enzymes was conducted in soybean plants under greenhouse conditions. The OE were applied to the first trifolium of each plant and after 72 hours five disks of 1.5 cm in diameter, the first trifolium (treated) and the second (untreated) trifolium of each plant were collected for analysis of carbohydrates, proteins , Peroxidases, polyphenoloxidases and phenylalanine ammonia-lyase in a spectrophotometer. The bioassay to verify the severity of the disease attack was conducted in soybean plants conditioned in a greenhouse. The treatments were constituted of the four citrus species in the concentrations of 0.1 and 0.5% with five replications. After ten days the symptoms were evaluated the severity of the disease according to the proposed diagrammatic scale. The OE of the different citrus species significantly inhibited the spore germination, with prominence for *C. vulgaris* that at 0.1% already promoted total inhibition. OE promoted an increase in the activity of the enzymes already in the concentration of 0.1%. Higher induction was observed in treated trefoils, indicating local effect. For severity, the trifoliols treated with *C. reticulata* and *C. vulgaris* species at concentrations of 0.1 and 0.5% did not present disease development. These results indicate the great potential of essential oil of the citrus species tested for the control of Asian rust in the soybean crop.

Keywords: Alternative control. Protection of plants. Antifungal activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. JUSTIFICATIVA.....	9
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
4.1 A CULTURA DA SOJA.....	11
4.2 FERRUGEM ASIÁTICA (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>).....	12
4.2.1 Histórico.....	12
4.2.2 Etiologia, modo de penetração e disseminação.....	14
4.2.3 Sintomatologia.....	15
4.2.4 Controle.....	16
4.3 USOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS COMO FORMA DE CONTROLE ALTERNATIVO.....	17
4.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1 OBTENÇÃO DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i> E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
5.2 BIOENSAIO 1: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	22
5.3 BIOENSAIO 2: INDUÇÃO DE ENZIMAS DE DEFESA.....	23
5.3.1 Proteínas totais.....	24
5.3.2 Atividade de Peroxidases.....	25
5.3.3. Atividade de Polifenoloxidasas.....	25
5.3.4 atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL.....	25
5.3.5 Carboidratos.....	26
5.4 BIOENSAIO 3: SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA EM PLANTAS DE SOJA.....	26
5.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 BIOENSAIO 1: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	28
6.2 BIOENSAIO 2: ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA.....	31
6.3 BIOENSAIO 3: SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA EM PLANTAS DE SOJA APÓS APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	37
7 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) (Merrill)) é originária da Ásia, mais precisamente da região da China Antiga, era plantada há pelo menos cinco mil anos espalhando-se pelo mundo por intermédio dos viajantes ingleses e por imigrantes japoneses e chineses (RODRIGUES, 2013).

São várias as atividades econômicas que constituem o complexo agroalimentar no Brasil, destacando-se entre elas a cadeia agroindustrial da soja (MEDICE et al., 2016). Atualmente a cultura da soja apresenta importância comercial extremamente relevante para a economia brasileira (SILVA et al., 2016). O Brasil é o segundo maior produtor de grãos, tendo na safra 2015/2016 uma produção de 95 milhões de toneladas, com uma área plantada de 33,177 milhões de hectares e uma produtividade com quebra de 2,8 kg/há (EMBRAPA, 2016).

Dentre os principais fatores que afetam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção da soja, estão as doenças, algumas chegam a atingir níveis de danos econômicos que podem levar a perdas significativas (MEDICE, 2007). Dessas destacam-se as causadas por fungos, e dentro desse grupo causando danos expressivos a cultura está a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow), que segundo dados de Medice (2007), chegam a atingir 60% da área cultivada com soja e/ou até danos totais, em curto período de tempo e com grande nível de severidade.

Após ter sido relatada na safra 2000/2001 no Paraná, a ferrugem asiática, tornou-se a principal doença da cultura da soja, causando danos ao rendimento de grãos (perda de 2,67 milhões de toneladas de grãos) devido à desfolha precoce (MESQUINI et al., 2011). O uso de fungicidas representa a principal medida de controle dessa doença. No entanto, o controle químico com o uso intensivo de fungicidas pode causar danos ao meio ambiente, ao agricultor (intoxicação), além do surgimento e desenvolvimento de patógenos resistentes, e elevar o custo total de produção.

Nesse sentido faz-se necessário a busca por fontes alternativas de controle do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. O uso de métodos alternativos pode permitir ainda a obtenção de produtos para mercados diferenciados, sem uso de agrotóxicos. Entre os métodos alternativos, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas tem

demonstrado grande potencial no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e pela capacidade de induzir mecanismos de defesa em plantas (BIGATON et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial do óleo essencial de espécies cítricas no controle da ferrugem asiática e na indução de resistência de plantas de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a eficiência do óleo essencial de espécies cítricas sobre a germinação de esporos e no desenvolvimento de tubos germinativos do fungo *P. pachyrhizi*;
- Avaliar o efeito de óleos essenciais de espécies cítricas na indução de enzimas relacionadas à defesa em plantas de soja;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais de espécies cítricas na severidade da ferrugem asiática em plantas de soja.

3. JUSTIFICATIVA

A soja é uma espécie que é cultivada e explorada no Oriente a mais de cinco mil anos, porém no Ocidente só foi cultivada na metade do século vinte, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram sua exploração comercial (EMBRAPA, 2004).

Atualmente graças as suas características nutritivas industriais, e a sua adaptação a diferentes latitudes, solos e condições climáticas está dentre as principais oleaginosas, e se destaca com participação de 51% do total produzido no mundo (CÂMARA, 2011).

É uma espécie exótica para o Brasil e de grande interesse socioeconômico, em função dos teores elevados de óleo (20%) e proteína (40%), da alta produtividade de grãos e da possibilidade de adaptação a ambientes diversos

(ROCHA, 2009). Em termos de produção mundial, o Brasil ocupa a segunda colocação, vindo após os Estados Unidos, as mais importantes áreas de cultivo localizam-se nos Estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2016).

Dentre os fatores limitantes da produtividade estão às doenças, com destaque para a ferrugem asiática, doença está com grande incidência na região de Toledo e Cascavel (PR) na safra 2014/2015 (EMBRAPA, 2016). De acordo com Henning (2014), a ferrugem pode aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo os primeiros sintomas caracterizados por minúsculos pontos (no máximo 1 mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada, com correspondente protuberância (urédia), na parte inferior da folha.

O controle dessa doença é feito geralmente com inúmeras aplicações de fungicidas químicos, esse uso intensivo e indiscriminado de defensivos agrícolas tem causado diversos problemas no meio ambiente, intoxicação de agricultores; eliminação de microrganismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica ou de organismos utilizados em programas de controle biológico; resistência de fitopatógenos, a certos defensivos, entre outros (BIGATON et al., 2013).

Assim, o emprego de produtos alternativos mostra-se como uma opção viável para diminuir os impactos do controle químico, dentre estes produtos enquadram-se os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas (STANGARLIN, 2007). Estes óleos apresentam constituintes complexos e variáveis, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre, dentre os quais se destacam os de baixo peso molecular, como os monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES; SPITZER, 2000).

Os óleos essenciais de citros têm a sua disponibilidade no mercado garantida devido às plantas cítricas ocuparem o primeiro lugar na produção mundial de frutos, sendo as laranjas responsáveis por 64% do volume de produção, o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, sendo que o Estado de São Paulo produz 82% do total produzido no Brasil (GLÓRIA, FILHO, GLÓRIA 2001).

Por essa razão busca-se através desse trabalho uma forma de controle alternativo para a ferrugem asiática, com a utilização de óleo essencial de espécies

cítricas que diminuem os gastos e os impactos oriundos do sistema convencional de controle.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A CULTURA DA SOJA

A soja é uma planta pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (ROCHA, 2009). É uma planta anual, autógama, herbácea, de porte ereto, caule ramoso, com 0,8 a 1,5 m de comprimento, folhas do tipo pecioladas, com três folíolos cordiforme, flores reunidas em cachos curtos, axilares, sésseis, brancas, violáceas ou amarelas (BERUSKI, 2013). Vagens levemente arqueadas, contendo de uma a cinco sementes, suas sementes podem ser lisas, globosas ou elípticas, com hilo castanho, podendo variar de acordo com a variedade (MISSÃO, 2006). As sementes apresentam coloração branca, amarela escura, negras, verde amarela ou verde matizada, o sistema radicular da soja é constituído de raiz axial principal e de raízes secundárias distribuídas em quatro ordens (ROCHA, 2009).

O ciclo da cultura pode variar de 75-100 dias para as mais precoces há 160-200 dias para as mais tardias, então reunidas em grupos de maturação, de acordo com ciclo, os quais são geralmente denominados como precoces, semiprecoces, médios, semitardios e tardios (MISSÃO, 2006). Podendo seu ciclo fenológico variar de acordo com época de semeadura, características genéticas das variedades, tipos e morfologia do solo, e regiões de cultivo (BERUSKI, 2013).

Durante séculos a soja permaneceu circunscrita ao Oriente, pois inexistia o intercâmbio com as civilizações ocidentais, entre 200 A.C. e o século III D.C., difundiu-se para o norte da China, Coréia e Japão (CÂMARA, 2011).

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882, por Gustavo Dutra, então professor da Escola de Agronomia da Bahia, que realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares introduzidas daquele país (EMBRAPA, 2004).

O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Segundo dados da Embrapa (2004), foi somente a partir dos anos

40 que ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941.

A soja como lavoura comercial, chegou ao Paraná em meados dos anos 50, até então a cultura era quase uma curiosidade, sua produção se dava em pequenas lavouras e se destinavam ao consumo doméstico, e alimentação de suínos. (EMBRAPA, 2003). A partir da década de 1960 a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil, com uma rápida expansão (EMBRAPA, 2004).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), “a soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país, o aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores.”

A soja é uma das oleaginosas consideradas mais importantes para a vida humana na terra, especialmente pela sua capacidade de produzir grandes quantidades de proteínas de excelente qualidade para a alimentação animal e de óleo para consumo humano (RODRIGUES, 2013)

Segundo Câmara (2011), a planta de soja e seus derivados provenientes do processamento industrial dos grãos apresentam inúmeras utilizações relevantes à economia do país: adubação verde, como leguminosa fixadora biológica de nitrogênio; na alimentação humana na forma de óleo, margarina, panificação, massas alimentícias, simulados de carne, leite de soja, alimentos dietéticos, biscoito/s, soja cozida, brotos de soja, balas, alimentos infantis, molhos, etc.; na nutrição animal, como planta fenada, silagem, farelo, soja torrada; além de seus usos industriais tais como adesivos, veículo para antibióticos e outros produtos medicinais, tintas, fabricação de fibras, isolantes, inseticidas, tecidos, sabões, cosméticos, massas para vidraçarias, solvente para tintas de impressão gráfica, biopolímeros para fabricação de plástico biodegradável, etc.

Segundo dados do MAPA (2015), a indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite.

A produção de soja no mundo, apesar da sua importância econômica, limita-se a poucos países, a maior parte da produção é realizada pelos Estados Unidos da

América, Brasil, Argentina e a China, que juntos, produziram 89,5% de toda a soja produzida no mundo, em 2004 (MAPA, 2015).

Como as demais culturas, a soja enfrenta diversos problemas fitossanitários que podem comprometer a produtividade, bem como a qualidade final do produto. Atualmente, podem-se destacar como problemas mais comuns, a ferrugem-asiática, o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary), os nematóides (*Meloydogine incognita* e *Meloydogine javanica*) e a qualidade fisiológica e sanitária das sementes produzidas (JUHÁSZ, 2013).

A soja é infectada por duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora* que causa a doença conhecida como ferrugem: a *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur, nativa no Continente Americano e que ocorre em leguminosas silvestres e cultivadas, desde Porto Rico até o sul do Estado do Paraná (Ponta Grossa), e a temida *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow, presente na maioria dos países asiáticos e na Austrália e ausente nas Américas até a safra 1999/00 (YORINORI et al., 2003).

4.2 FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)

4.2.1 Histórico

A importância da ferrugem asiática no Brasil pode ser avaliada pela sua rápida expansão e virulência, e pelo montante de perdas causadas, de 2002 a 2005 as regiões mais afetadas no Brasil foram Bahia, Centro- Oeste e o Norte, chegando a atingir perdas de 100% e colheitas inviáveis no restante do país (YORINORI, 2006).

A ferrugem asiática foi constatada pela primeira vez no continente americano no Paraguai, em cinco de março e no Estado do Paraná, em 26 de maio de 2001, na safra 2001/02 apresentou grande expansão atingindo os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (EMBRAPA, 2003).

Supõe-se que esporos do fungo tenham atravessado o Oceano Atlântico ou o Oceano Pacífico, vindo dos países do Sul da África (Zimbabwe e Zâmbia, desde

1998, ou África do Sul, em 2001), onde a doença tem causado severas perdas, ou da Austrália, onde a ferrugem ocorre há várias décadas (YORINORI et al., 2003).

Segundo Kimati et al., (2005) amostras de folhas infectadas foram analisadas por meio de técnicas moleculares e comparadas com amostras de *P. meibomiae*, sendo realizada a confirmação da introdução de *P. pachyrhizi* na América do Sul.

A ferrugem asiática tem causado perdas consideráveis no Brasil e trazido, à tona, discussões que envolvem a defesa vegetal, nesse sentido faz-se necessário estudos que visem táticas de manejo que diminuam ou controlem seu ataque diminuindo os prejuízos causados com a severidade da mesma (EMBRAPA, 2004).

Em função de sua fácil disseminação pode ser encontrada em todas as regiões produtoras do Brasil com reduções de até 75% de produtividade, perdas de 80% a 90% de rendimento foram registradas na Austrália e na Índia respectivamente (KIMATI et al., 2005). Nos últimos anos vieram à tona reclamações a cerca da eficácia e do período residual dos fungicidas, com aplicações seqüenciais sendo feitas a intervalos de 10 a 12 dias, com produtos de residual comprovados de 20-25 dias (YORINORI, 2006).

4.2.2 Etiologia, modo de penetração e disseminação

O patógeno responsável pela Ferrugem Asiática é um fungo do grupo dos basidiomicetos, filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Phakopsoraceae, que atuam como parasitas obrigatórios e não apresentam fase saprofítica em seu ciclo vital (AMORIM, REZENDE, FILHO, 2011).

Ferrugens são classificadas com fungos biotróficos, ou seja, necessitam do hospedeiro vivo para sobreviver e se multiplicar (EMBRAPA, 2004). A sobrevivência da ferrugem da soja, na entre safra, tem ocorrido em cultivos de soja sob irrigação no inverno na região dos Cerrados (Mato Grosso e Tocantins) e na Região Nordeste (Maranhão), mas pode também ocorrer em hospedeiros alternativos, tais como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*), fava (*Vicia faba*), trevo (*Alysicarpus vaginalis*), trevo branco (*Trifolium repens*), alfafa (*Medicago* spp.) tremoço (*Lupinus* spp) etc. pois *P. pachyrhizi* infecta 95 espécies de plantas em mais de 42 gêneros (YORINORI 2006).

Segundo Kimati et al. (2005), são dois os tipos de esporos conhecidos em *P. pachyrhizi*: uredósporos e teliósporos. Os uredósporos (15-24 µm) são os mais comuns e se constituem na fase epidêmica da doença, são ovóides a elípticos, largos, com paredes com 1,0 µm de espessura, densamente equinulados e variando de incolor a castanho amarelo pálido.

A penetração ocorre de forma direta através da cutícula, o processo de infecção depende da disponibilidade de água livre na superfície da folha, sendo necessário no mínimo seis horas, com um máximo de infecção ocorrendo com 10-12 horas de molhamento foliar (YORINORI et al., 2003). Temperaturas entre 15 e 28°C são favoráveis para infecção, as paredes dos télios são de coloração castanha amarela pálida a incolor, com espessura de 1,0 µm ou ligeiramente mais grossa na parte apical dos teliósporos da parte superior (YORINORI, 2006).

P. pachyrhizi apresenta grande variabilidade patogênica e, através do uso de variedades diferenciadoras, várias raças têm sido identificadas, em Taiwan, foram identificadas nove raças e no Japão, onze (AMORIM, REZENDE, FILHO, 2011). No Brasil, a quebra de resistência em uma safra evidenciou a existência de raças, quatro genes dominantes com herança independente são conhecidos e denominados como *Rpp1- Rpp4* (KIMATI et al., 2005). A disseminação da ferrugem é feita principalmente pela dispersão dos uredósporos pelo vento e a doença não é transmitida por sementes (JUHÁSZ, 2013).

4.2.3 Sintomatologia

A doença manifesta-se de forma irregular, o sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo-avermelhada na parte superior da folha (KIMATI et al., 2005). Em infecções severas podem coalescer, formando grandes manchas castanhas, e causar o amarelecimento e queda da folha. Na fase inicial pode ser confundida com septoriose (*Septoria glycines*), porém, difere desta por apresentar coloração mais avermelhada e pela ausência de halo amarelado ao redor da lesão, na parte inferior da folha, a lesão é de coloração castanha clara a castanha escura, tendo uma pequena elevação no centro, de coloração mais clara, essa parte mais clara do

centro constitui a cutícula que cobre a massa de uredósporos produzida no interior do tecido da folha (YORINORI et al., 2003).

A infecção por *P. pachyrhizi* causa rápido amarelecimento ou bronzeamento e queda prematura das folhas, impedindo a plena formação dos grãos, quanto mais cedo ocorrer a desfolha menor será o tamanho dos grãos e conseqüentemente maior a perda do rendimento e da qualidade dos grãos (EMBRAPA, 2003).

Em casos severos quando a doença atinge a soja na fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar aborto e a queda das vagens, resultando em até perda total do rendimento (YORINORI et al., 2003).

4.2.4 Controle

Quando se fala em controle da ferrugem asiática da soja é importante considerar o manejo da cultura, devendo-se evitar a semeadura da soja na época mais favorável a doença, realizando semeadura no começo de outubro e, fundamentalmente, fazer o levantamento periódico da lavoura para detectar a ocorrência da doença no seu início (YORINORI et al., 2003).

Para reduzir o risco de danos à cultura, segundo a Embrapa (2004), as estratégias de manejo recomendadas no Brasil para essa doença são: respeitar o período do vazio sanitário; utilizar cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, para que a cultura fique menos tempo exposta ao patógeno; eliminar plantas voluntárias de soja e o cultivo na entressafra, respeitando a época do vazio sanitário, de 60 a 90 dias, com o objetivo de reduzir a quantidade de inóculo nos cultivos da safra de verão, monitorar a lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura; utilizar fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), preventivamente ou assim que aparecerem os sintomas e utilizar cultivares resistentes, quando disponíveis. O monitoramento da doença e sua identificação nos estádios iniciais são essenciais para a utilização eficiente do controle químico, devendo ser realizada a vistoria frequente da lavoura (YORINORI et al., 2003).

Deve-se considerar que a doença se inicia pelas folhas inferiores da planta, devendo o monitoramento sempre ser realizado a partir do terço inferior das plantas (EMBRAPA, 2004) o monitoramento das lavouras é recomendado a partir da

emissão das primeiras folhas no estágio vegetativo, uma vez que a doença pode ocorrer em qualquer estágio fenológico da cultura, (o monitoramento deve ser intensificado e quase diário, nas semeaduras mais tardias e uma vez detectada a ferrugem na região) (YORINORI et al., 2003).

No ano de 2015 foram lançadas as cultivares TMG 2158 IPRO e a TMG 7062 IPRO que, fazem parte de um seleto grupo cultivares únicas no mundo dotadas de tecnologia que lhes garante resistência a ferrugem asiática da soja, sendo conhecidas como “soja inox”. O gene de resistência à ferrugem presente nessas duas cultivares, tecnologia Inox®, foi desenvolvida pela TMG e permite à planta maiores condições de conviver com a doença no campo (EMBRAPA, 2016).

A existência de raças dificulta o controle através da resistência vertical, sendo o controle químico a ferramenta mais utilizada atualmente para evitar perdas pela ferrugem (KIMATI et al., 2005). Atualmente, cerca de 90 fungicidas possuem registro no MAPA para o controle da ferrugem asiática, contudo, em decorrência da menor eficiência observada com os fungicidas triazóis, desde a safra 2007/2008, utiliza-se de misturas comerciais de triazóis com estrobilurinas para o controle da ferrugem (JUHÁSZ, 2013). Porém, apesar de eficazes causam contaminação ambiental, riscos à saúde humana e animal, impacto na biodiversidade e maiores desequilíbrios biológicos por interferirem nas populações não-alvo, além de selecionarem isolados resistentes (BIGATON et al., 2013).

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas tem por finalidade oferecer alternativas para diminuir a dependência desses agrotóxicos e contribuir para se praticar uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade moderna (BETTIOL, 2015).

4.3 USOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS COMO FORMA DE CONTROLE ALTERNATIVO

Atualmente é crescente a busca por processos alternativos de controle economicamente viáveis e os produtos naturais incluindo compostos inorgânicos e uma variedade de extratos de plantas pode oferecer controle de doenças em plantas (BENCHIMOL, SILVA, VERZIGNASSI, 2008). Os extratos de plantas são conhecidos

há séculos como medicinais e seu uso se estendeu a aplicações para o controle de pragas e doenças de plantas, entre eles destacam-se os óleos essenciais, sendo alvo de muitos estudos (BETTIOL, 2015), a literatura dos últimos anos demonstra o grande potencial na aplicação dos óleos essenciais contra uma ampla gama de patógenos tanto em ensaios realizados *in vitro* quanto *in vivo* em condições de casa de vegetação e pós-colheita, demonstrando o grande potencial do uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos (BITU, 2014).

Carnelossi et al., (2009), testando óleos essenciais obtidos de quatro espécies de plantas medicinais, o capim limão (*Cymbopogon citratus* L.), eucalipto (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson), menta (*Mentha arvensise* (L.)) e o estragão (*Artemisia dracunculus* L.) obtiveram êxito na inibição do crescimento micelial e esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente causal da antracnose do mamão em pós-colheita.

Lorenzetti et al., (2012) encontraram resultados promissores tanto no controle *in vivo* do fungo causador de ferrugem (*Puccinia nakanishikii* Dietel), quanto na redução da severidade dessa doença em plantas de capim-limão, desta vez realizado sobre a atividade *in vitro* e *in vivo* de vários produtos naturais, dentre os quais os óleos essenciais de (*Corymbia citriodora* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry), e (limão (*Citrus limonum* L.)), no controle da ferrugem das folhas do capim-limão (*C.citratus* [DC.] Stapf).

Segundo Sholberg e Gaunce (1995), as substâncias sintetizadas naturalmente pelas plantas, em resposta às necessidades ecológicas e de desenvolvimento, protegem-nas contra o ataque de patógenos por induzirem enzimas de defesa tais como peroxidases e polifenoloxidasas. Assim, os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas vêm sendo utilizados em estudos visando à redução do uso de fungicidas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos.

Têm-se registros da utilização dos óleos essenciais (OE) desde épocas anteriores ao antigo Egito, passando pela Idade Média e chegando ao início do século XX através de tratados de aromaterapia (MEDICE et al., 2007). Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelas plantas para sua sobrevivência e que exercem as funções de autodefesa e de atração de polinizadores (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009), e nas plantas são produzidos nas flores, cascas de

frutos, folhas e pequenos grãos, raízes, cascas da árvore, resinas da casca, sementes.

O Brasil tem lugar de destaque na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais, a posição do Brasil deve-se aos OE de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos, no passado, o país teve destaque como exportador de OE de pau-rosa, sassafrás e menta, nos dois últimos casos, passou à condição de importador (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

Para realizar o controle de fitopatógenos, a agricultura brasileira ao longo das últimas décadas, seguiu as tendências da agricultura mundial, com foco na produtividade, em detrimento dos impactos provocados ao ambiente com utilização indiscriminada de produtos químicos (BENCHIMOL, SILVA, VERZIGNASSI, 2008).

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas visa oferecer alternativas para diminuir a dependência dos agrotóxicos e contribuir para as práticas de agricultura adequadas às novas demandas de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade (BETTIOL, 2015).

Em função destes fatores, a procura por produtos alternativos que sirvam como defensivos e causem menores danos ao ambiente, sejam estes químicos, biológicos, orgânicos ou naturais, vem crescendo (MEDICE et al., 2007). Poderiam ser enquadrados nesta categoria, os diversos biofertilizantes, as caldas, os agentes de biocontrole e os óleos essenciais (FERNANDES, 2000), sendo que a utilização de óleos essenciais de plantas tem mostrado resultados promissores no controle de patógenos de plantas.

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* estão entre os mais utilizados no mundo, sendo que o Brasil destaca-se na produção destes, principalmente por serem obtidos como subprodutos da indústria de suco (GOMES et al., 2016).

De origem asiática, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia, entretanto aqui, com melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, as citrinas se expandiram para todo o país, atualmente sendo o Brasil o maior produtor de laranja e o estado do Paraná ocupando o sexto lugar em nível de produção nacional (ALVES, MELO, 2001).

As frutas cítricas - laranjas, limões, limas, tangerinas, mandarinas e o grapefruit - são conhecidas e apreciadas há milênios devido ao seu aroma e sabor

agradáveis. Os óleos essenciais (OEs) cítricos são obtidos normalmente por prensagem das suas cascas (BITU, 2014).

Embora seja uma mistura complexa de mais de 200 componentes, o óleo dos *Citrus* podem ser estudados como uma mistura sintética dos seus 2 componentes-chave: o limoneno, representante da fração terpênica, e o linalol, representante da fração oxigenada (ALVES, MELO, 2001).

4.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Os diferentes mecanismos de defesa de uma planta (estruturais e bioquímicos) são geneticamente controlados e dependem da expressão dos mesmos no momento e magnitude adequados após o contato do patógeno com o hospedeiro (KIMATI et al., 2005).

A resistência natural de plantas contra os patógenos é baseada em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção (BARROS et al., 2010), porém as plantas possuem outros mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes e são acionados ou ativados depois que elas são expostas aos agentes de indução. Nesse caso, a resistência é dita induzida, quando as plantas percebem as agressões, então conseguem se adaptar, sobrevivendo mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado (BONALDO et al., 2005).

A indução da resistência pode ocorrer devido à infecção localizada, por tratamentos com produtos microbianos ou através de compostos orgânicos ou inorgânicos aplicados e pode envolver diferentes mecanismos de defesa (PASCHOLATI, 1998).

No contexto da proteção de plantas, a resistência induzida pode ser visualizada como uma das medidas de controle alternativo. A indução de resistência em plantas vem sendo estudada desde o início do século XX, porém, apenas recentemente, a potencialidade de seu emprego no controle de enfermidades tem recebido o merecido destaque (STANGARLIN et al., 1999).

A resistência induzida é caracterizada pela ativação de mecanismos bioquímicos, que podem envolver a síntese e atividade de peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

A enzima peroxidase (H_2O_2 oxidoreductase) a qual está presente nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, é conhecida por participar

de vários processos fisiológicos de grande importância. Na indução de resistência, as peroxidases são bastante estudadas devido a sua importância nos processos de defesa e, na maioria das vezes, o aumento na atividade está diretamente relacionada à redução da severidade da doença (HOAGLAND, 1990).

As polifenoloxidasas geralmente são abundantes em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 2005).

Já a fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima largamente estudada por fisiologistas devido a sua importância no metabolismo secundário das plantas. Assim, entre as funções da FAL, destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina, síntese de substâncias que agem como protetores contra estresses abióticos como antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV, ou proteção contra estresses bióticos como a ação de fitopatógenos (DIXON, LAMB, 1990).

A indução de resistência em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa em resposta ao tratamento com agentes eliciadores os quais são moléculas capazes de proteger contra infecções subsequentes por patógenos (STANGARLIN et al., 1999). Entre os eliciadores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas e óleos essenciais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chaves nos metabolismos primário e secundário (CAMPOS et al., 2004). Neste contexto o grupo de peroxidases representa um papel importante na defesa das plantas, o aumento na atividade de enzimas de defesa induzida por agentes bióticos ou abióticos permanece no tecido vegetal mesmo após o tratamento com o patógeno virulento (CAMPOS et al., 2004).

No entanto se questiona até que ponto a indução é benéfica para a planta já que para ocorrer tal mecanismo de defesa, ocorre um gasto energético muito grande e um custo adaptativo alto, por desencadear diversos processos e alterações metabólicas nas plantas (BONALDO et al., 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS, no município de Laranjeiras do Sul- PR.

5.1 OBTENÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi* E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* foi obtido de folhas de plantas de soja com sintomas de ferrugem asiática em área de cultivo de soja do município de Laranjeiras do Sul-PR, na comunidade Rincão Grande. As folhas coletadas foram mantidas por 24 horas em saco plástico com umidade para estimular a esporulação. Em seguida, foi realizada a raspagem dos conídios produzidos com pincel de cerdas macias umedecidas em água destilada. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada em hemocítômetro à concentração de 2×10^4 conídios mL^{-1} , concentração essa utilizada em todos os experimentos. Por ser um fitopatógeno biotrófico o fungo foi mantido em plantas de soja cultivar convencional susceptível a ferrugem asiática (1041) em casa de vegetação no período dos experimentos.

Os óleos essenciais de citros foram obtidos comercialmente da cidade de Curitiba- PR. Foram avaliados os óleos essenciais de laranja (*Citrus sinensis*), tangerina (*Citrus reticulata*), laranja azeda (*Citrus vulgaris*) e toranja (*Citrus paradisi*). Esses óleos foram diluídos em água destilada contendo Tween 20 a 0,1% e agitados durante 10 minutos antes da utilização nos bioensaios.

5.2 BIOENSIAO 1: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Para avaliação *in vitro* da atividade dos óleos essenciais de citros sobre o agente causal da ferrugem, inicialmente foi preparada a suspensão de esporos contendo 20 mL de água destilada mais os esporos raspados da folha de soja identificada com a doença, com a ajuda de um pincel, ajustada essa suspensão a concentração de 2×10^4 esporos/mL. Em seguida, lâminas de microscopia estéreis foram inicialmente revestidas por uma camada delgada de ágar-água 1%. Cada

lâmina representou uma parcela (Figura 1) e recebeu 30 μ L da suspensão de esporos (urediniósporos) e 30 μ L de cada tratamento.

Figura 1 - Lâminas de microscopia revestidas por Agar-água, contendo suspensão de esporos e as diferentes concentrações dos óleos essenciais.



Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida a 23°C por 12 horas no escuro, quando a germinação foi paralisada com 10 μ L de azul algodão de lactofenol e determinada a porcentagem de germinação através da determinação da germinação de 50 esporos por parcela com auxílio de microscópio óptico, sendo o resultado transformado em porcentagem. Também foram medidos os tubos germinativos de 10 esporos representativos de cada parcela para determinação do desenvolvimento dessas estruturas, através de ocular milimetrada de microscópio óptico. Constituíram tratamentos as concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2% de cada óleo essencial diluídos em 0,1% de Tween 20, além da testemunha água destilada contendo 0,1% de Tween 20 com cinco repetições.

5.3 BIOENSAIO 2: INDUÇÃO DE ENZIMAS DE DEFESA

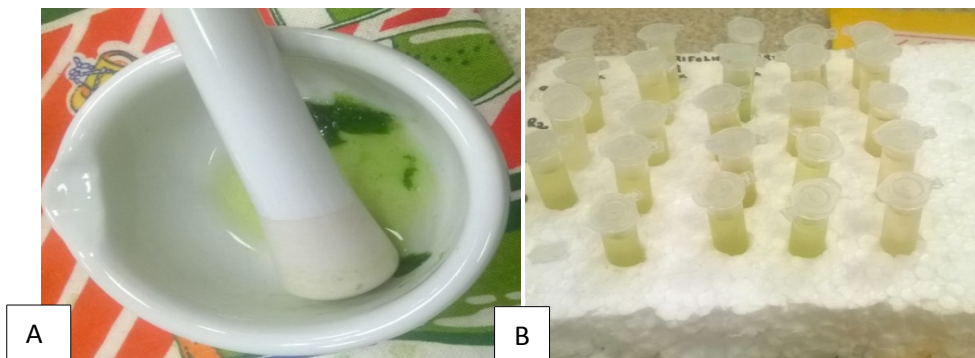
Para avaliar a indução das enzimas de defesa sementes de soja foram semeadas em vasos de volume 1L, contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, na proporção de 2:1:1 v/v. Os tratamentos foram constituídos dos óleos

essenciais de citros na concentração de 0,1%, sendo água contendo 0,1% de Tween 20 como testemunha. As plantas permaneceram em casa de vegetação semi climatizada, com irrigação três vezes ao dia, durante dois minutos, e temperatura entre 25 e 28°C.

Os tratamentos foram aplicados no primeiro trifólio de cada planta aos 45 dias após a semeadura, e após 72 horas foram coletados cinco discos de 1,5 cm de diâmetro, do primeiro trifólio (tratado) bem como do segundo trifólio (não tratado) de cada planta, sendo armazenados em caixa de isopor contendo gelo, até serem congeladas a -20°C e posteriormente maceradas em cadinho contendo 0,04 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 4 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 molar pH 6,8.

O macerado foi acondicionado em tubos de eppendorf (2 ml) e levados para centrifuga durante vinte minutos (14.500 rpm) a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi acondicionado em outro eppendorf e novamente congeladas as amostras até as posteriores análises (Figura 2). Foram determinados os teores de carboidratos, proteínas, peroxidases, polifenoloxidasas, e fenilalanina amonialiase.

Figura2 - Almofariz e pistilo para maceração dos trifólios coletados para posterior centrifugação (A) e tubos de microcentrifuga com extrato proteico (B).



5.3.1 Proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Homogeneizando-se 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL do extrato enzimático e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brillant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 125 mL de água destilada). Após 5 minutos de incubação, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (595 nm). Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubetade referência

consistiu de 800 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μL do reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína ($y=0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína com base em albumina de soro bovino). Os resultados foram expressos em $\text{mg proteína}^{-1}\text{mL amostra}^{-1}$.

5.3.2 Atividade de Peroxidases

A atividade de peroxidases foi determinada espectrofotometricamente pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO & PASCHOLATI, 1999). A mistura de reação foi realizada em cubeta de 3 mL e consistiu de 0,2 mL de extrato protéico e 2,8 mL do substrato para enzima (306 μL de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). A reação foi conduzida a 30°C por dois minutos. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância a 470 nm $\text{min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$.

5.3.3. Atividade de Polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas (PFO) foi determinada quantificando a oxidação do catecol convertido em quinona (DUANGMAL e APENTEN (1999)). O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 900 μL do substrato e 100 μL do extrato enzimático. A reação foi conduzida à temperatura de 30°C acompanhada de leituras em espectrofotômetro, a 420 nm. As leituras foram realizadas por um período de 2 min. A diferença entre a leitura no primeiro minuto e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância $\text{min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$.

5.3.4 atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), onde 100 μL do extrato enzimático foram

acrescidos de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40°C durante 2 h. Ao final desse período adicionaram-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato enzimático e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em mg de ácido trans-cinâmico h^{-1} mg proteína $^{-1}$.

5.3.5 Carboidratos

Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972). Para isso, foi retirada uma alíquota de 50 μL dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida a 100°C por 10 min e resfriada em banho de gelo. A leitura das absorbâncias foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorbância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de 30 concentrações de glicose. Os valores foram expressos em equivalente mg de glicose h^{-1} mg proteína $^{-1}$.

5.4 BIOENSAIO 3: SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA EM PLANTAS DE SOJA

Para avaliar a severidade de ataque da doença, plantas de soja cv 1041 foram cultivadas em vasos com capacidade para dois litros contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, no volume de 2:1:1 v/v.

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação (25 a 28°C) utilizando-se uma planta por vaso. Os tratamentos foram aplicados por aspersão no primeiro trifólio em soja 40 dias após a semeadura. Após três dias, as folhas tratadas, bem como o segundo trifólio em soja não tratado, foram inoculadas por aspersão até

ponto de escorrimento com suspensão de *Phakopsora pachyrhizi* (2×10^4 esporos/ml).

Após o surgimento dos sintomas (10 dias) foi avaliada a severidade de ataque da doença com auxílio da escala diagramática proposta por GODOY et al., 2006. Constituíram tratamentos as concentrações de 0,1 e 0,5% de cada óleo essencial com cinco repetições, sendo água contendo 0,1% Tween 20 como testemunha. Após os testes preliminares de germinação foram escolhidas apenas as concentrações citadas acima.

Ver com o orientador.

5.5 ANÁLISE DOS DADOS

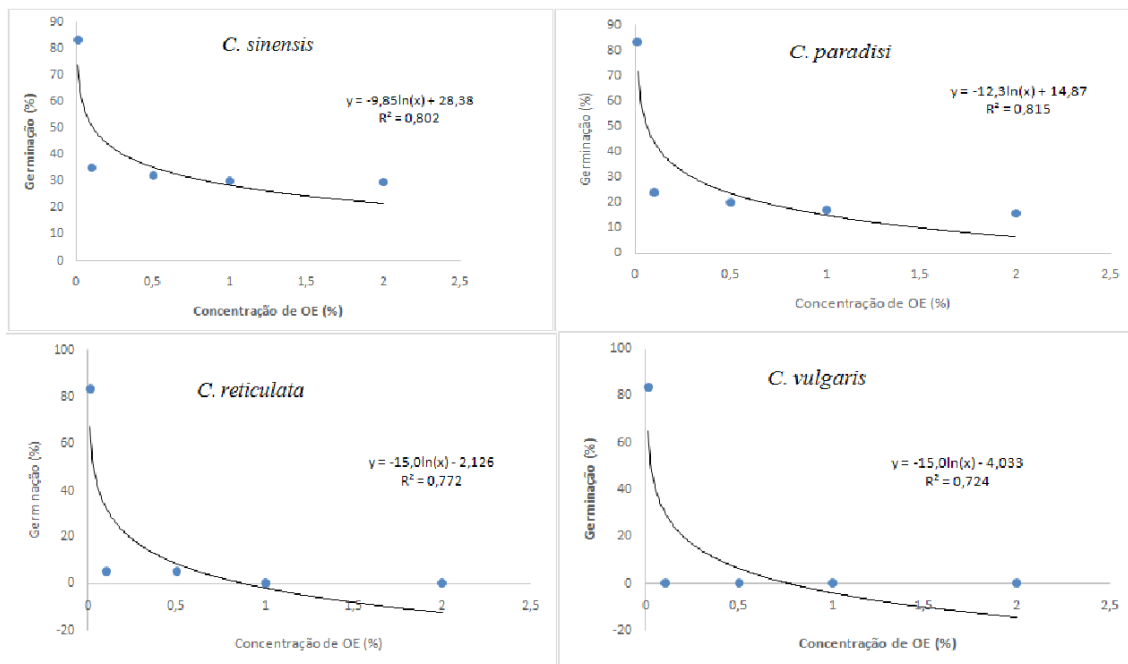
Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para análise estatística dos resultados obtidos, foram submetidos inicialmente a testes de normalidade e homogeneidade, sendo transformados quando necessário. Os resultados foram submetidos à análise de variância seguidos de análise de regressão para as concentrações de óleo essencial de citros utilizadas e teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade para os dados qualitativos. Análises foram realizadas com auxílio do programa computacional Sisvar. (FERREIRA, 2007).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 BIOENSAIO 1: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro*

Todos os óleos essenciais das diferentes espécies cítricas inibiram a germinação de urediniósporos do fungo causador ferrugem asiática já a partir da concentração de 0,1%. Resultado mais expressivo foi promovido pelo óleo essencial de *C. vulgaris* que a 0,1% já inibiu totalmente a germinação (Figura 3).

Figura 3 - Porcentagem de germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* sob diferentes concentrações de óleos essenciais de quatro espécies cítricas.



C. reticulata, nas concentrações de 0,1 e 0,5% permitiu uma germinação de 5% em comparado com a testemunha reduziu 77,5% da germinação dos urediniósporos. Nas concentrações de 1 e 2% também inibiu totalmente a germinação dos urediniósporos. Medice et al., (2007) encontrou resultados parecidos mas utilizando óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), citronela (*Cymbopogon nardus*), nim (*Azadirachta indica*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) nas concentrações 1, 0,5, 1,0 e 0,3%, respectivamente, inibiram em 100% a germinação dos uredinósporos de *Phakospsora pachyrhizi*, em meio água-ágar. Resultado semelhante foi obtido também por Bonaldo et al., (2005),

que utilizando óleo essencial de *E. citriodora* a 1% obteve germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* de apenas 5%.

Os óleos essenciais das outras duas espécies de citros *C. sinensis* e *C. paradisi* também foram eficientes na redução de germinação de urediniósporos da ferrugem. *C. paradisi* promoveu redução na porcentagem de urediniósporos germinados em 65% na concentração de 2% se comparado com a testemunha e *C. sinensis* reduziu 48,1% também na concentração de 2% em relação à testemunha. Isso demonstra o potencial antimicrobiano do óleo essencial não só de *C. sinenses*, mas das quatro espécies cítricas testadas sobre esse fitopatógeno, mesmo em baixas concentrações.

A pesquisa realizada *in vitro* é o primeiro passo para identificar o potencial de produtos oriundos de plantas medicinais da flora nativa no controle de fitopatógenos. Trabalhos desenvolvidos com óleo essencial têm indicado o potencial dos mesmos em diversos patossistemas, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

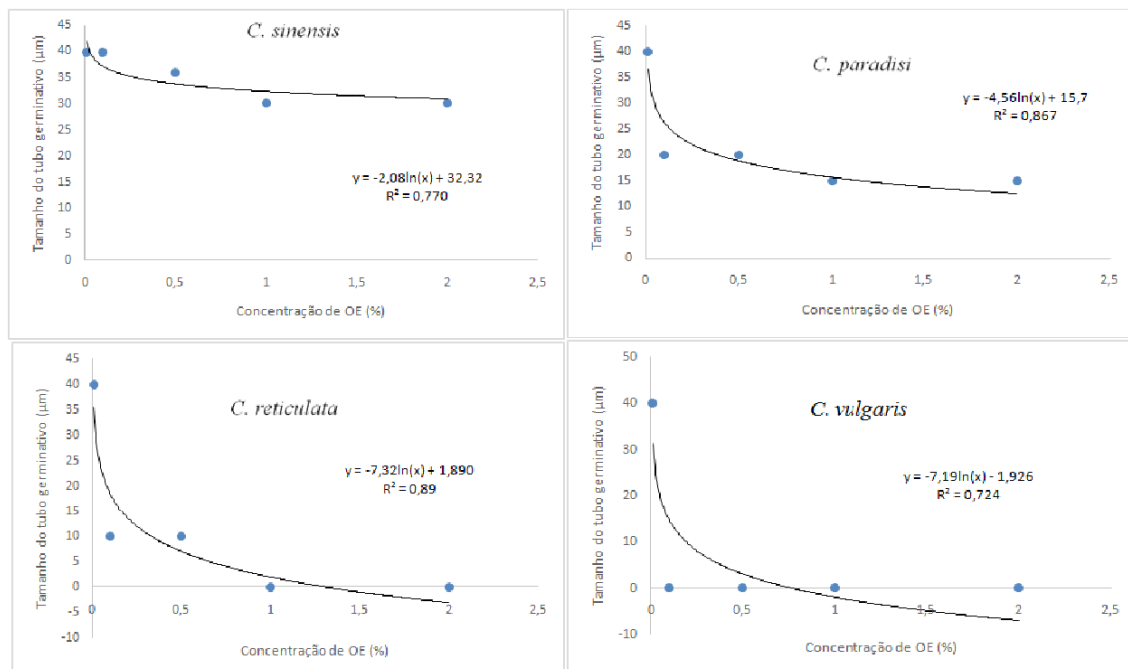
Sharman e Tripathi (2006) estudando 10 agentes patogênicos pós-colheita observaram que o óleo essencial das cascas de *C. sinensis* apresentou um amplo espectro de ação contra todos os micro-organismos testados.

Yamashita et al., (2011) testaram capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) como controle alternativo de *Phakopsora pachyrhizi* e observaram que seus extratos são promissores para testes que visam o controle da ferrugem asiática da soja. Extratos aquosos de folhas de timborno (*Himatanthus articulatus*), jurema preta (*Mimosa bimucronata*), tamboril (*Entorolobium contortisiliquum*) e peroba (*Aspidosperma polyneuron*) reduziram significativamente a germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi*. (COSTA; COIMBRA; SANTOS, 2010).

Salustiano et al., (2006), observaram que o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (candeia) é eficiente no controle alternativo, pois inibiu completamente a germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Maciel et al., (2009) empregando extratos aquosos de tiririca (*Cyperus rotundus*) obtidos por infusão, obtiveram inibições de até 14% na germinação de esporos de *P. pachyrhizi*.

O mesmo se deu para o tamanho dos tubos germinativos já que se não há germinação de urediniósporos não ocorre desenvolvimento de tubo germinativo, isto ocorreu para *C. vulgaris* (Figura4).

Figura4 - Tamanho do tubo germinativo de *Phakopsora pachyrhizi* sob diferentes concentrações de óleos essenciais de quatro espécies cítricas



O óleo essencial de *C. reticulata* reduziu já na concentração de 0,1%, 30µm do tamanho dos tubos germinativos se comparado com a testemunha uma redução de 75%, como nas concentrações de 1 e 2% não houve germinação.

O óleo essencial de *C. paradisi* reduziu 20µm (50%) do tamanho dos tubos germinativos em relação à testemunha nas concentrações de 0,1 e 0,5% e 25 µm para as concentrações de 1 e 2%, redução de 37,5% comparado com a testemunha (40 µm).

Tanto para a porcentagem de germinação quanto para tamanho de tubo germinativo o óleo de *C. sinensis* foi o que apresentou menores reduções. Reduzindo apenas nas concentrações de 1 e 2% 10 µm (25%) em relação a testemunha.

Medice et al., (2007), verificaram *in vitro* que o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* a 0,5% foi capaz de inibir 100% a germinação de esporos de *P. pachyrhizi*, conseqüentemente não havendo também desenvolvimento de tubos germinativos.

Medice (2007), também verificou que utilizando óleo essencial de Melaleuca foi significativa a redução de esporos germinados (0,33%) de *P. pachyrhizi*, quando comparados com a testemunha (94,67% de esporos germinados) e ausência de emissão de tubo germinativo em relação à testemunha.

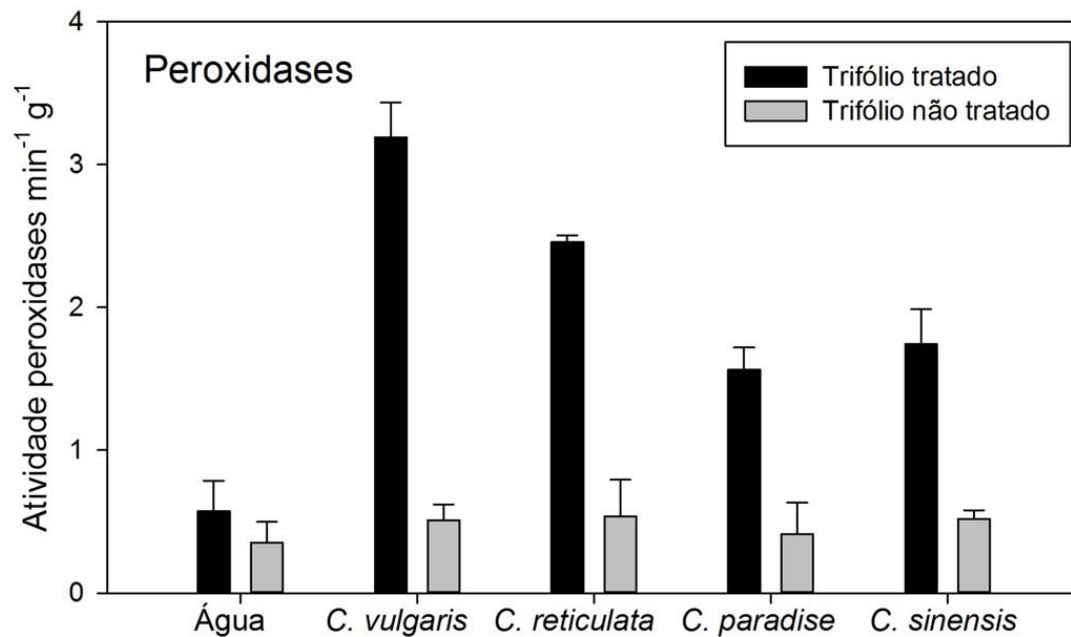
Pires e Piccoli (2012) verificaram que utilizando óleo essencial de limão galego (*Citrus aurantifolia*) houve uma atuação inibitória do óleo obtido da casca dos limões sobre o crescimento micelial de *Penicillium expansum*. Sharma e Tripathi verificaram que o óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre *Aspergillus niger* promoveu a inibição total do crescimento micelial do fungo, na concentração de 3 µL/mL, após 7 dias de incubação, demonstrando o potencial efeito dos óleos essenciais de espécies cítricas, no controle direto de fungos patogênicos.

Segundo Wolffenbüttel (2007) o óleo essencial não é um produto simples de 1 componente, é um produto composto podendo ultrapassar 300 componentes químicos diferentes. A redução da porcentagem de germinação e do tamanho dos tubos germinativos, pode ter se dado devido aos componentes químicos dos óleos essenciais apresentarem estruturas diversas como terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanóicos, alifáticos não-terpênicos, heterocíclicos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, acetatos, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica. Isso justifica a ação como fungicida e antifúngica dos óleos essenciais (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

6.2 BIOENSAIO 2: ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

Os óleos essenciais das quatro espécies cítricas avaliadas induziram a atividade de peroxidases em folhas de soja (Figura 5). O óleo essencial de *Citrus vulgaris* foi o que promoveu maior indução, seguido de *C. reticulata*, *C. sinensis* e *C. paradisi*. A indução somente foi observada em trifólios tratados, indicando efeito local.

Figura 5 - Atividade de peroxidases em trifólios de plantas de soja tratados ou não com óleos essenciais de espécies cítricas. Barras representam o erro padrão da média.



Para os trifólios que receberam tratamentos, todos se diferenciaram estatisticamente, inclusive em comparado com a água. No entanto não houve diferença significativa para trifólios não tratados para todos os tratamentos e em relação a testemunha água.

As peroxidases têm papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, além de estarem também fortemente relacionadas com mecanismos de defesa em relação à patógenos e/ou aos vários estresses abióticos (LEE; KIM; LEE, 2001). As peroxidases participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno, da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção, e na biossíntese de lignina (STANGARLIN, et al., 2010). Segundo mesmo autor mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas.

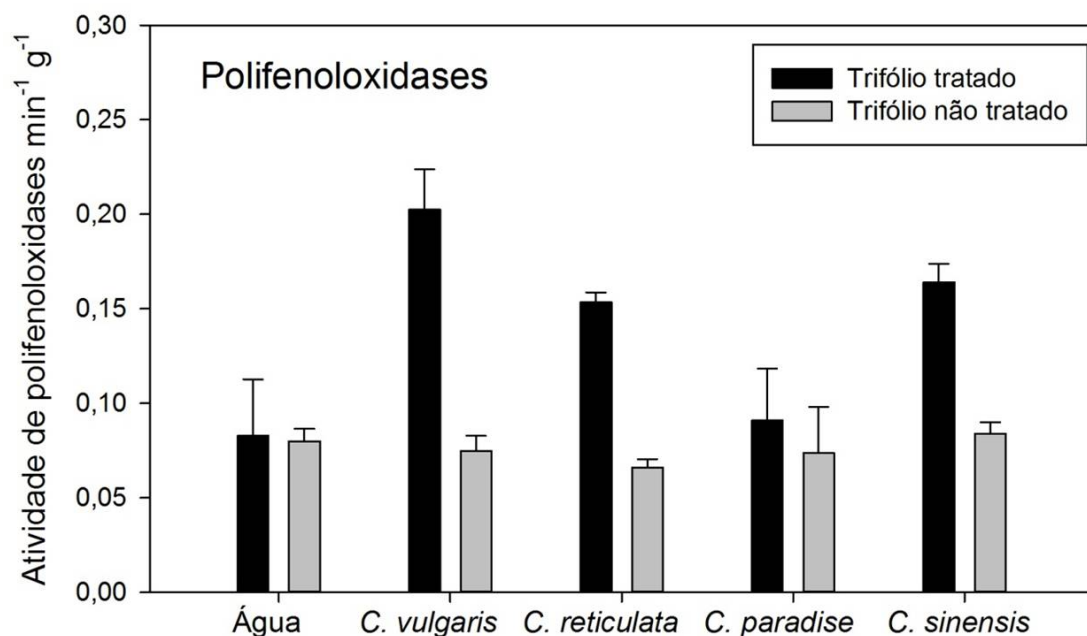
O efeito local da atividade das peroxidases pode ter se dado porque esse grupo de enzimas juntamente com as polifeniloxidasas, lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos ou quando são induzidas por elicitores, um dos resultados mais estudados deste fenômeno é o aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (BARROS et al., 2010).

Resultado semelhante foi observado por Temporal (2014), que utilizando extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* em soja, constatou que a atividade de peroxidase em folhas de soja foi aumentada por todos os tratamentos quando comparadas com a testemunha água.

Dados semelhantes foram obtidos também em pesquisa realizada por Franzener (2011). O autor citado observou que o extrato aquoso de eucalipto (EA) induziu aumento da atividade de peroxidase em pepino, principalmente, 48 horas após o tratamento.

Os resultados da indução da atividade de polifenoloxidasas (Figura 6) foram semelhantes ao de peroxidases. O óleo essencial de *Citrus vulgaris* promoveu maior indução, seguido dos óleos de *C. sinensis*, *C. reticulata*, e *C. paradisi*. Observou-se também a diferença significativa dos resultados entre os trifólios tratados e não tratados indicando efeito local dos óleos na indução em soja.

Figura 6 - Atividade de polifenoloxidasas em trifólios de plantas de soja tratados ou não com óleos essenciais de espécies cítricas. Barras representam o erro padrão



Percebe-se também que não houve diferença significativa para testemunha (água), entre trifólios que receberam ou não os tratamentos. Isso indica que o efeito local de indução das polifenoloxidasas se deu devido aos componentes químicos

dos óleos, já que os trifólios tratados da testemunha receberam água contendo 0,1% Tween 20 que também foi adicionado nos tratamentos contendo os óleos essenciais.

Não houve diferença significativa também entre os trifólios não tratados para *C. vulgaris* e *C. reticulata* em comparado com a testemunha. Para os trifólios tratados *C. reticulata* e *C. sinensis* não se diferenciaram estatisticamente entre si.

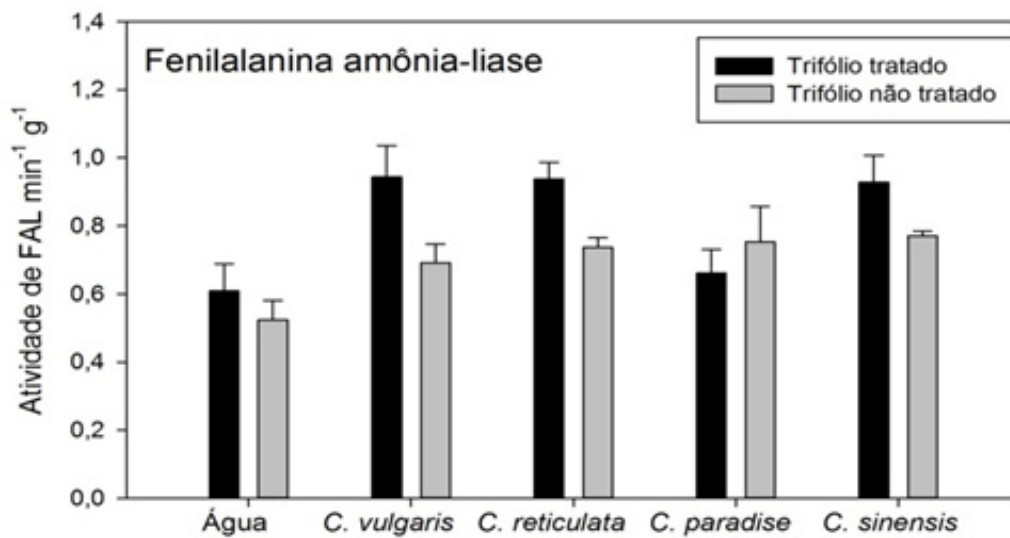
Semelhanças aos resultados obtidos foram observadas em Vigo et al. (2009), que verificaram maior produção de polifenoloxidasas para as plantas de feijão vagem quando tratadas com tinturas de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. E *Hedera helix*.

Resultado semelhante também foi verificado por Itako (2008) onde a aplicação preventiva do OE de *C. citratus* nas folhas de tomate provocou um aumento local (folhas tratadas) na atividade de peroxidase e polifenoloxidase.

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário (STANGARLIN, et al., 2010). A indução desses mecanismos de defesa podem representar importante método para controle alternativo de doenças, e tem sido observada em diferentes espécies vegetais e por diferentes agentes bióticos e abióticos.

Já para a atividade de fenilalanina amônia-liase (Figura 7) percebe-se que a indução ocorreu tanto em trifólios tratados e não tratados, indicando que a atividade dessa enzima chave não foi estimulada pela aplicação dos tratamentos, no entanto *C. vulgaris*, *C. sinensis* e *C. reticulata* apresentaram maior indução respectivamente, sendo *C. paradisi* o que promoveu menor indução da enzima.

Figura 7 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em trifólios de plantas de soja tratados ou não com óleos essenciais de espécies cítricas. Barras representam o erro padrão da média



Resultado semelhante foi observado por Temporal (2014), onde as análises estatísticas revelaram que não houve diferença significativa para a atividade de FAL (fenilalanina amônia liase) em cotilédones de soja, indicando que não houve diferenças entre os extratos de capim-limão dentro do intervalo de doses estudado.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas, devido a importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. (STANGARLIN et al., 2010).

Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, o ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. (STANGARLIN et al., 2010).

A fenilalanina amônia liase é estimulada e regulada por fatores ambientais, tais como nível nutricional das plantas, luminosidade e infecção por fungos (BARROS et al., 2010). Nesse sentido justifica-se a indução em trifólios tratados e não tratados já que as plantas de soja utilizadas no bioensaio se encontravam em ótimo estado nutricional e recebiam diariamente uma quantidade considerável de luz, tendo assim o efeito do fitocromo estimulando o desenvolvimento da mesma nas plantas.

Quando avaliados os teores de carboidratos (Figura 8) e proteínas (Figura 9), percebe-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, tanto para

trifólios tratados quanto para trifólios não tratados, demonstrando que não houve incremento no teor de carboidratos e proteínas pela aplicação dos tratamentos. Embora tenha sido observada aumento na atividade de algumas enzimas relacionadas a defesa, essas alterações não foram suficientes para alterar o teor total de proteínas, já que as proteínas totais são um conjunto mais complexo que as enzimas anteriores e os carboidratos que foram contabilizados pela metodologia foram apenas os açúcares redutores.

Figura 8 - Atividade de carboidratos em trifólios de plantas de soja tratados ou não com óleos essenciais de espécies cítricas. Barras representam o erro padrão da média

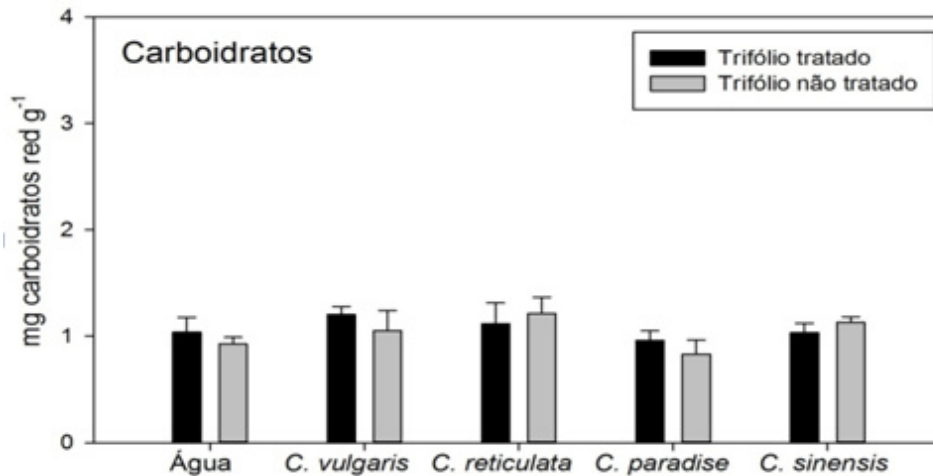
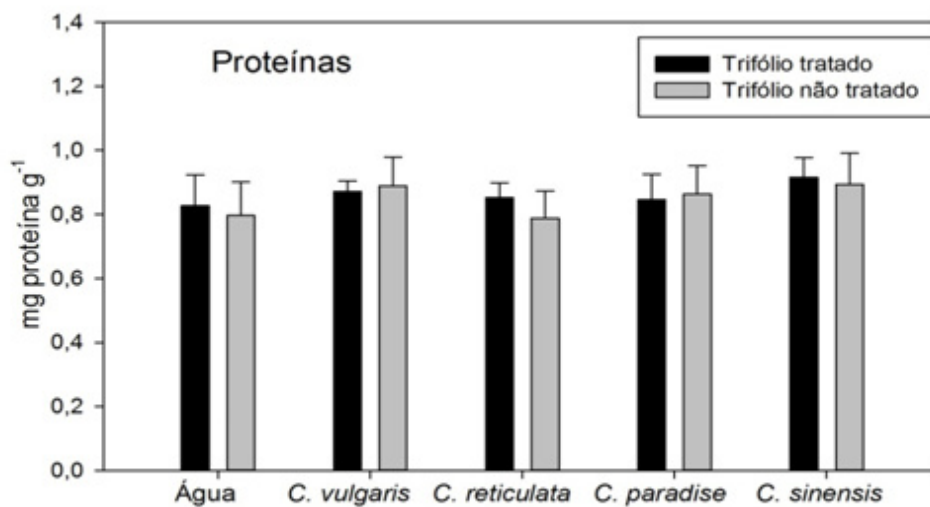


Figura 9 - Atividade de proteínas em trifólios de plantas de soja tratados ou não com óleos essenciais de espécies cítricas. Barras representam o erro padrão da média



Stangarlin et al., 2007, menciona que as proteínas relacionadas a patogênese (PR) são classificadas em cinco grupos, sendo que as PR- 2 e PR -3 protegem as plantas contra a infecção de fungos. Mas todas são solúveis em meio ácido, têm baixo peso molecular e resistem a proteases, enzimas que decompõem proteínas. Esse fato de serem solúveis em meio ácido pode justificar o porque do óleo essencial não ter induzido a atividades das proteínas totais, já que estes óleos apresentam constituintes complexos e variáveis tendo como elemento chave o limoneno que constitui em aproximadamente 75% as espécies cítricas utilizadas nos tratamentos e que se deriva em diversos ácidos, entre eles o ácido perílico (SIMÕES; SPITZER, 2000).

6.3 BIOENSAIO 3: SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA EM PLANTAS DE SOJA APÓS APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

De forma semelhante aos bioensaios anteriores para a severidade da ferrugem em plantas de soja, as espécies *C. reticulata* e *C. vulgaris* se apresentaram mais eficientes em comparação a *C. paradisi* e *C. sinensis*, já que na concentração de 0,1% em trifólios tratados não houve desenvolvimento na doença. No entanto as quatro espécies cítricas diminuíram significativamente a severidade da doença (Tabela 1) quando comparado as médias entre trifólios. No entanto *C. sinensis* nas duas concentrações obteve porcentagem superior de severidade em trifólios não tratados quando comparados com a testemunha.

Tabela 1. Severidade da ferrugem asiática em plantas de soja após aplicação dos tratamentos

TRATAMENTOS		SEVERIDADE %	
		Trifólios Tratados	Trifólios Não tratados
<i>C. sinensis</i>	0,10%	10,6 Bb	20,38 Aa
	0,50%	7,56 Bc	18,90 Aab
<i>C. paradisi</i>	0,10%	6,38 Bc	16,90 Abc
	0,50%	5,30 Bc	15,78 Ac
<i>C. reticulata</i>	0,10%	0,00 Bd	6,76 Ad

<i>C. vulgaris</i>	0,50%	0,00 Bd	5,30 Ad
	0,10%	0,00 Bd	2,42 Ae
	0,50%	0,00 Bd	2,34 Ae
Testemunha		18,60 Aa	18,64 Aab

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se também que não houve diferença estatística a 5% de probabilidade para *C. reticulata* e *C. vulgaris* (0,1 e 0,5%) para trifólios tratados, já que esses tratamentos inibiram 100% o desenvolvimento da doença. No entanto todos os tratamentos foram eficientes quando comparadas as médias entre trifólios, reduzindo significativamente a severidade da doença. O único tratamento que não diferiu foi a testemunha entre os trifólios, indicando que o que ocasionou a diferença nos demais foi a aplicação dos óleos, já que a testemunha era composta por água no trifólios não tratados, e composta por água contendo 0,1% Tween 80 nos tratados.

Resultado semelhante foi observado por Medice (2007), onde foi possível constatar que os tratamentos diferiram da testemunha, quando utilizado óleo essencial de nim, tomilho e citronela. Medice et al., (2007) também verificaram que o óleo essencial de tomilho reduziu a severidade da doença em média de 34% a 61%. Com relação à eficiência de óleos, Medice et al., (2007) também relataram que o de *C. citriodora* reduziu em mais de 50% a severidade da ferrugem asiática da soja, indicando o potencial efeito inibitório de óleos essenciais no controle de ferrugem asiática em soja.

Silva et al., (2012), utilizando óleo essencial de *C. sinensis* e *C. limon* conseguiram reduzir significativamente a severidade de podridão mole em alface (*P. carotovorum*), indicando que além do potencial efeito antifúngico esses óleos também podem ser utilizados em tratamento antibactericidas.

Como visto nos resultados anteriores os óleos essenciais do gênero *Citrus*, induzem a atividade de enzimas ditas como chave na indução de resistência a fitopatógenos, com ação local. Nesse sentido se justifica a severidade da doença ter sido menor nos trifólios submetidos aos tratamentos preventivos, já que nos

bioensaios anteriores ficou evidenciado que a planta consegue produzir enzimas de defesa após aplicação dos óleos essenciais de espécies cítricas.

7. CONCLUSÃO

Pôde-se verificar que os óleos essenciais de espécies cítricas tiveram efeito direto na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* e foram capazes de reduzir a severidade da ferrugem da soja em plantas em casa-de-vegetação. Além disso, são potencias indutores de peroxidases e polifenoloxidasas, enzimas importantes na defesa de plantas e na resistência vegetal, com efeito local.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. **Cultura do Citrus**. 2001. Disponível em <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>> acesso em 20 de outubro de 2015.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, B. A. **Manual de Fitopatologia**. Vol1. Princípios e conceitos, quarta ed. SP. 2012. Pg 479-482.

BARROS, F. C; SAGATA, E; FERREIRA, L, C, C., JULIATTI, F, C. Indução De Resistência em Plantas Contra Fitopatógenos. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239,2010.

BENCHIMOL, L. R.; SILVA, C, M.; VERZIGNASSI, J. R. Utilização de Substâncias Naturais para o Controle de Doenças de Plantas na Região Amazônica. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA. 2008.

BERUSKI, G, C. **Incidência e Severidade de Mofo Branco em Soja Cultivada Sob Diferentes Densidades Populacionais e Espaçamentos**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa. 2013.

BETTIOL, W. **Árvore do Conhecimento-agricultura e Meio Ambiente: controle Alternativo**. 2015. Disponível em:<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

BIGATON, D.; BACCHI, L. M. A.; NAZARI, A. S.; GAVASSONI, W. L.; ZANELLA, C. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja **Revista Ciência Agrônômica** vol.44 n°.4 Fortaleza Oct./Dec. 2013.

BITU, P. I. M. **Bioatividade do óleo essencial de canela-da-índia (*cinnamomumzeylanicum* blume) no controle da mancha alvo do mamoeiro**.63 f. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Maranhão. São Luiz. 2014.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Vol. 32, Nº. 3, 588-594, 2009.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.128-134, 2004.

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

CÂMARA, G.M. S. **Introdução ao Agronegócio Soja**. Nov. 2011. SP. Disponível em <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv584/584%20Soja%2001%20%20Apostila%20Texto%20%20Agronegocio%20Soja%202011.pdf>>. Acesso em 10 de outubro de 2015.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I.F; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSORIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 637-643. 2004.

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

COSTA, S. X.; COIMBRA, J. L.; SANTOS, F. Efeito de extratos obtidos de plantas do cerrado baiano sobre a germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Magistra**. v. 22, n. 1, p. 71-74, 2010.

DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.339-367,1990.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative estudy of poliphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) e potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 351-359, 1999.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil**. 2004. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em 10 de outubro de 2015.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja**. 2016. Disponível em <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2017.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina, 2011. 261p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 15).

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil**.2004. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm>> acesso em 18 de agosto de 2015.

FERNANDES, M. C. A. Emprego de métodos alternativos de controle de pragas e doenças na olericultura. In: Congresso ibero-americano sobre utilização de plástico na agricultura, 2.; simpósio latino-americano de produção de plantas medicinais,

aromática e condimentares, 1., 2000, São Paulo, SP. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 110-112, 2000.

FRANZENER, G. **Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalypto citriodora***. Tese de Doutorado. 217 f. Universidade Estadual de Maringá. Paraná, 2011.

FIALHO, R.O.; PAPA, M. F. S.; PEREIRA, D. A. S.; NISHIMURA, C. S. **Efeito de óleos essenciais sobre *Puccinia allii***. Resumo. Acesso em 12 de janeiro de 2017, disponível em <file:///C:/Users/User/Downloads/RESUMO_38727541819_ptg.pdf>, acesso em 01 de janeiro de 2017.

FERREIRA, D.F. **SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0**. Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.

GLÓRIA, F. J.M.; FILHO, F. A. M.; GLÓRIA, B. A. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'valência' (*citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta botânica brasileira**. vol.15 n.º1 SP Jan./Apr. 2001.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**.31, 63-68. 2006.

GOMES, M. S.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, J.; MIRANDA, C. A. S. F.; MACHADO, S. F.; PASSOS, L. O. ***Citrus sinensis*: caracterização química e atividade biológica frente a dois fungos fitopatogênicos**. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A, M, R.; GODOY, CV.; SEIXAS, C, D, S.; YORINORI, J, T.; COSTAMILAN, L, M.; FERREIRA, L, P.; MEYER, M,C.; SOARES, M, R.; DIAS, W, P. **Manual de identificação de doenças de soja**.5.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105942/1/Doc256-OL.pdf>>acesso em 29 de setembro de 2015.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington, American Chemical Society, 1990.p.87-113.

ITAKO, A. T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 2008.

JUHÁSZ, A. C. P.; PÁDUA, G. P.; WRUCK, D. S. M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N. R. **Desafios fitossanitários para a produção de soja**. 2013. MG. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/96308/1/cpamt-wruck-0100-3364-2013.pdf>>. Acesso em 20 de outubro de 2015.

KIMATI, H.; AMORIM; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. 4^a edição. São Paulo: **Agrônômica CERES**. 2005. Pg 576.

LEE, S.H.; KIM, E.S.; LEE, M.Y. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. **Phytochemistry**, v.58, p.859-864, 2001.

LEVER, M.A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, n.1, p.273-279, 1972.

LORENZETTI, E. R.; CONCEIÇÃO, D. M.; SACRAMENTO, L. V. S.; FURTADO, E. L. Controle da ferrugem das folhas do capim-limão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 571-578, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722012000400001&nrm=iso>. Acesso em 18 outubro de 2015.

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

MACIEI, P, H, F, Z, A.; VIECELLI, C, A.; MIORANZA, F.; DALLA NORA, T.; Controle in vitro de *Phakopsora pachyrhizi* por extratos de *Cyperus rotundus*. **Tropical Plant Pathology**. 2009.

MAPA. Ministério da agricultura. **A cultura da Soja**. 2016. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em 01 de janeiro de 2017.

MAPA. Ministério da agricultura. **A cultura da Soja**. 2015. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais>>. Acesso em 30 de setembro de 2015.

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

MEDICE, R. **Produtos alternativos no manejo alternativo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)**. Tese de Mestrado. 115 f. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2007.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JUNIOR, R. G. M.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Lavras, 2007. Disponível em <<http://www.agrolink.com.br/downloads/140793.pdf>>. Acesso em 10 de outubro de 2015.

MESQUINI, R. M.; ESTRADA, K. R. F. S.; VIEIRA R. A.; NASCIMENTO J, F. Controle e progresso temporal da ferrugem asiática da soja sob controle alternativo em campo. **Summa phytopathol**. vol.37 n.º1 Botucatu Jan./Mar. 2011.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Junho de 2006, Maringá. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n.1 - p.7-15, jan./jun. 2006.

- PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Sacharomyces cerevisiae* e outros genes bióticos na proteção de plantas contra patógeno**. Piracicaba, Tese (Livre Docência), 123p – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 1998.
- PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. Vol 71. nº2. São Paulo . 2012.
- ROCHA, R, S. **Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude**. 59 f. Dissertação. Universidade Federal da Paraíba. Piauí, abr, 2009.
- RODRIGUES, J. B. B. **Componentes de crescimento e produção de três cultivares de soja utilizando diferentes adubações**. Universidade Federal da Paraíba. 38 f. PB. Trabalho de Conclusão de Curso. 2012.
- SALUSTIANO, M. E.; FILHO, A, C, F.; POZZA, E, A.; CASTRO, H, A. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish) na inibição *in vitro* de *Cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. **Cerne**, v. 12, n. 2, p. 189-193, 2006.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. S.; STANGARLIN, J. R.; CRUS, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. 2003. Acesso 01 de janeiro de 2017, disponível em pdf.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2006, v.22: 587-593.
- SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A. P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. **Horticultural Science**, v.30, p.1271-5, 1995.
- SILVA, C. L.; SOUZA, E. B.; FELIZ, K. C. S.; SANTOS, A.; SILVA, M. V.; MARIANO, R. L. R. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira** vol30 nº4. Oct./Dec. 2012.
- SILVA, R. A. M. Caracterização química do óleo essencial da casca do *citrus sinensis*. 2013. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABQxIAD/caracterizacao-quimica-oleo-essencial-casca-citrus-sinensis-obtido-por-hidrodestilacao-aparelho-clevenger?part=2>> . Acesso 10 outubro 2015.
- SILVA, T. A.; SILVA, P. B.; SILVA, E. A. A.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Condicionamento fisiológico de sementes de soja, componentes de produção e produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.2, p.227-232, fev, 2016.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES. C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. p. 394-412.

STANGARLIN, J. R. Uso de extratos e óleos essenciais no controle de doenças de plantas - **Fitopatologia Brasileira**, v. 32 suplemento, p. 94– 6, 2007.

STANGARLIN JR.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI ,M,H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. Biotecnologia **Ciência & Desenvolvimento** 11:16-24.1999.

TEMPORAL, W. G. **Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 2014. p. 50-59.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA. Paraná 2003. Sistema de produção Embrapa 2.dezembro. pags 154-157.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VIGO, S. C; MARINGONI, A. C.;CAMARA, R. C.; LIMA, G. P. P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**. v.35, n.4, p.293-304. 2009.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and chitinases from chickpea (*Cicera riantinum*L.). **Planta**, v.189, p.60-69, 1993.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Óleo essencial**. 2007. Disponível em <http://www.oleoessencial.com.br/artigo_Adriana.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2015.

YAMASHITA, P. A. et al. **Inibição da germinação de esporos da ferrugem asiática da soja por extratos de capim cidreira**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44. 2011. Bento Gonçalves, 2011.

YORINORI, J, T.; PAIVA, W. M.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F. **Ferrugem da soja (*Phakopsora pachlizi*): identificação e controle**. Informações agronômicas nº 104. Dezembro/2003.

YORINORI, J, T. **Ferrugem asiática da soja: o desafio continua e como aprimorar o seu controle**. Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja. 2006. Disponível em <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/469164/1/ferrugem.pdf>> Acesso em 01 de janeiro de 2017.