

EFEITO DE EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE *ACHILLEA MILLEFOLIUM*  
EM DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *CORYNESPORA CASSIICOLA* E  
PROTEÇÃO DE PEPINO À MANCHA DE *CORINESPORA*

M.M. Carlos<sup>1</sup>, K.R.F. Schwan-Estrada<sup>1\*</sup>, A.T. Itako<sup>1</sup>,  
S.M. Bonaldo<sup>2</sup>, R.M. Mesquini<sup>1</sup>, J.B. Carvalho<sup>1</sup>, J.R. Stangarlin<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Av. Colombo, 5790 - Bloco I 45, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. E-mail:schwan@wnet.com.br

RESUMO

Medidas de controle de doenças por meio do uso de extratos e óleos essenciais vêm sendo investigadas como alternativa aos fungicidas convencionais. Este trabalho objetivou estudar o efeito antimicrobiano de extratos brutos aquosos e óleo essencial de *Achillea millefolium* no crescimento micelial (CM), na esporulação e na germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* bem como a atividade de peroxidase em plantas de pepino. Para isto, o extrato bruto aquoso (EBA) (1; 5; 10; 20 e 25%) foi incorporado ao meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e o óleo essencial (OE) (20, 40, 60, 100 e 200 mL) foi distribuído sobre a superfície do meio de cultura. Disco de micélio foi repicado para os diferentes meios e o crescimento micelial avaliado, diariamente, por 7 dias. Para os ensaios *in vivo*, plantas de pepino foram pulverizadas com EBAs nas concentrações 1, 10 e 25%, *Saccharomyces cerevisiae* 20% e água, aos quatro e dois dias antes e concomitantemente à inoculação com *C. cassiicola*. Foi avaliada a severidade da doença e a atividade da enzima peroxidase. Para EBA, não houve inibição do crescimento micelial, da germinação e da esporulação em todas as concentrações testadas. Entretanto, nos tratamentos com OE, houve inibição de até 63% do crescimento micelial. Na esporulação e germinação, a inibição foi de 100% e 98%, respectivamente, na alíquota de 200 µL para OE. No controle da doença, o tratamento mais efetivo foi EBA a 25% quando realizado concomitante à inoculação. No intervalo de tempo avaliado, não se constatou atividade da enzima peroxidase.

PALAVRAS-CHAVE: Controle alternativo, mil-folhas, *Cucumis sativus*, extrato bruto aquoso, óleo essencial.

ABSTRACT

EFFECT OF CRUDE EXTRACT AND ESSENTIAL OIL OF *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. ON THE *IN VITRO* DEVELOPMENT OF *CORYNESPORA CASSIICOLA* AND PROTECTION OF CUCUMBER AGAINST *CORINESPORA* LEAF SPOT. The control of diseases by using crude extracts (CE) and essential oils (EO) are being investigated as an alternative to conventional fungicides. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial effect of aqueous extracts and essential oil of *Achillea millefolium* on mycelial growth, sporulation and spores germination of *Corynespora cassiicola*, as well as peroxidase activity in cucumber plants. For this, crude extract (1; 5; 10; 20 and 25%) was incorporated into potato dextrose agar medium (PDA), and essential oil (20, 40, 60, 100 and 200 mL) was distributed over the surface of the PDA. The mycelial growth was measured daily for 7 days. In the *in vivo* test, cucumber plants were sprayed with crude extracts at concentrations 1; 10 and 25%, and *Saccharomyces cerevisiae* 20% (control), 4 and 2 days before and the same time as inoculation with *C. cassiicola*. The severity of disease and peroxidase activity were evaluated. For crude extract, neither mycelial growth nor spore germination and sporulation was inhibited at any of the tested concentrations. In the treatments with essential oil there was inhibition up to 63% of the mycelial growth. In the sporulation and spores germination the inhibition was 100% and 98%, respectively, for 200µL of EO. In the control of the disease the most

<sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

\*Bolsista Produtividade CNPq.

effective treatment was the crude extract 25% when carried out at the same time as the inoculation. In the evaluated period, no peroxidase activity was found.

KEY WORDS: Alternative control, yarrow, *Cucumis sativus*, crude extracts, essential oil.

## INTRODUÇÃO

*Corynespora cassiicola* (Bert. & Curt.) Wei é um patógeno com inúmeros hospedeiros, com sintomas que se caracterizam por manchas foliares, cujas formas e coloração variam de acordo com o hospedeiro encontrado (DUARTE *et al.*, 1978). No Brasil, a doença foi constatada sobre caupi, mamão, seringueira, cacaueteiro, acerola, soja, entre outros (ALMEIDA; YAMASHITA, 1978; DUARTE *et al.*, 1978; GENEROSO *et al.*, 2002). Em pepino, foi relatado, pela primeira vez, em 2002, em pepinos do tipo "Hishi Nari", procedentes de Indaiatuba, SP, e que apresentavam características como lesões foliares necróticas, com os bordos pardos-escuros e diâmetro de cerca de cinco milímetros (VERZIGNASSI *et al.*, 2003).

VERZIGNASSI *et al.* (2003) observaram que os primeiros sintomas da doença surgem inicialmente sob a forma de pequenas manchas, tipo "flecks", de tonalidade clara, que evoluem para manchas angulares, com o centro de cor palha e pequeno halo amarelo claro. Posteriormente, as manchas crescem, tomando formato arredondado e apresentando centro marrom claro e bordos encharcados de coloração olivácea.

Cultivos sucessivos de pepino "japonês", na região norte do Estado do Paraná, em estufas plásticas, tipo túnel alto, tornaram *C. cassiicola* um dos mais importantes patógenos nessa modalidade de cultivo, causando perdas de até 60% (VERZIGNASSI *et al.*, 2003; VIDA *et al.*, 2004). A mancha de corinespora tem ocorrido com intensidade nos períodos de primavera e verão, atingindo níveis epidêmicos dentro de poucos dias após a visualização dos primeiros sintomas nas plantas. Os fungicidas utilizados para o controle de outras manchas foliares em curcubitáceas não têm apresentado resultados práticos no controle dessa doença, e os híbridos utilizados na região têm apresentado alta suscetibilidade à mancha de corinespora. Outras práticas de manejo, como eliminação de restos culturais, maior espaçamento entre plantas e manejo de cortinas laterais das estufas, não têm reduzido a severidade da doença (VERZIGNASSI *et al.*, 2003).

Assim faz-se necessário o estudo de novas alternativas para o controle deste fitopatógeno, tais como o controle biológico e a indução de resistência. Trabalhos desenvolvidos explorando a atividade biológica de extrato bruto ou óleos essenciais de plantas medicinais têm indicado potencial no controle de fitopatógenos, por meio da indução de mecanismos

de defesa nas plantas ou pela inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos (STANGARLIN *et al.*, 1999; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008). O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a ação antimicrobiana de extrato bruto aquoso e óleo essencial da planta medicinal *Achillea millefolium* (mil-folhas) no desenvolvimento *in vitro* de *C. cassiicola* e verificar o seu efeito na proteção de *C. cassiicola* em plantas de pepino "japonês".

## MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Corynespora cassiicola* foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia (UEM) e mantido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas.

### Obtenção do extrato bruto aquoso (EBA) e óleo essencial (OE) de *Achillea millefolium*

Para a obtenção do extrato aquoso, folhas frescas de *A. millefolium* foram coletadas, pesadas e trituradas com caldo de batata em liquidificador de maneira a se obter as concentrações de 1%, 5%, 10%, 20% e 25% (p:v). Em seguida foi acrescentada a dextrose e ágar. Os meios foram autoclavados a  $120^\circ\text{C}$  por 20 min. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (arraste a vapor), sendo utilizados, em média, 2,5 kg de material vegetal (folhas e hastes frescas) (COSTA, 1986).

### Efeito *in vitro* do extrato bruto aquoso e do óleo essencial sobre *C. cassiicola*

O EBA e o OE de *A. millefolium* foram avaliados sobre o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de conídios de *C. cassiicola*. Para testar o efeito dos extratos sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*, após a solidificação do meio de cultura contendo os EBAs (como descrito anteriormente), um disco de 8 mm de diâmetro da colônia, foi repicado para o centro de cada placa de Petri. No ensaio, para os OEs, após esterilização do OE por filtração em membrana Millipore, alíquotas de 20, 40, 60, 100 e 200  $\mu\text{L}$  foram distribuídas na superfície de meio de cultura BDA, com alça de Drigalski. Após 2h, um disco de 8 mm de diâmetro, de uma colônia de *C. cassiicola* foi transferido para o centro de cada placa. A testemunha consistiu de placas contendo somente o meio BDA para os dois ensaios. As placas foram incubadas no escuro a  $28^\circ\text{C}$ . As avaliações foram realizadas por meio da

mensuração diária do diâmetro da colônia, correspondente à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, iniciando-se 24 horas após o início do trabalho e estendendo-se até quando as colônias do tratamento controle se desenvolveram até 2/3 da superfície total do meio de cultura da placa. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições para o EBA, nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 25%, e DIC com cinco repetições para OE nas alíquotas de 20, 40, 60, 100 e 200 µL além de cinco repetições da testemunha absoluta, sem EBA ou OE.

A esporulação foi determinada pela contagem total de esporos das colônias do experimento anterior, logo após o término da última mensuração. Em cada placa adicionou-se 10 mL de água destilada estéril e a colônia foi suavemente raspada com uma alça bacteriológica. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e os esporos contados em câmara de Neubauer. O número de esporos produzido foi expresso em número de conídios por cm<sup>2</sup> de colônia.

No ensaio de germinação de esporos, alíquota de 80 µL da suspensão de esporos ( $1,0 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>), provenientes das placas do experimento anterior, foram colocadas em pocinhos de placa utilizada em teste de ELISA (REGENTE *et al.*, 1997). A placa foi incubada sob luz constante à temperatura de  $25^\circ \pm 2^\circ$  C por um período de 3h, quando a germinação foi paralisada com 10 µL do corante azul de algodão. A avaliação foi realizada pela contagem de 100 esporos por pocinho, sendo considerados germinados quando apresentaram qualquer emissão de tubo germinativo. Utilizou-se o DIC com quatro repetições para o EBA nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 25%, e DIC com quatro repetições de OE nas alíquotas de 20, 40, 60, 100 e 200 µL além de quatro repetições da testemunha absoluta, EBA ou OE. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e a diferença entre as médias, quando significativa, foi comparada pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

#### **Controle *in vivo* de mancha de corinespora em pepino "japonês"**

Sementes de pepino "japonês" cv. Tsuyataru foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial e mantidas em casa-de-vegetação. A primeira folha verdadeira (15 dias de idade da planta) recebeu, por meio de aspersão com o auxílio de atomizador manual, EBA de *A. millefolium*, não autoclavado, nas concentrações de 1, 10 e 25%, *S. cerevisiae* a 20% e água (testemunha absoluta). As pulverizações foram realizadas 2 e 4

dias antes ou concomitantemente à inoculação com suspensão de conídios de *C. cassiicola* ( $5,2 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>). As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. Utilizou-se o DIC, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por três plantas, cinco tratamentos (testemunha absoluta, *S. cerevisiae* e EA de *A. millefolium* a 1, 10 e 25%) aplicados aos quatro dias, dois dias e zero horas (imediatamente) à inoculação com o patógeno. Foi avaliada a área foliar lesionada (conforme escala de notas, adaptada de CAMPBELL; MADDEN, 1990), após o surgimento das primeiras lesões na testemunha absoluta (água).

#### **Análise bioquímica (peroxidase de guaiacol) (E.C.1.11.1.7)**

As coletas das amostras de tecido das plantas foram realizadas imediatamente antes da inoculação (tempo A) e sete dias após a inoculação (tempo B) com *C. cassiicola*. Foram utilizados três tempos de aplicação dos tratamentos: quatro dias, dois dias e zero horas (imediatamente) à inoculação com o patógeno. Foram quatro repetições por tratamento, onde cada repetição consistiu de três plantas que correspondiam ao número de amostras coletadas para avaliar a atividade enzimática da peroxidase. O tratamento e a inoculação foram feitos nos primeiros pares de folhas verdadeiras.

Amostras de tecido vegetal, da segunda folha verdadeira, de plantas de pepino em cada tratamento foram coletadas. O material foi macerado em almofariz e a extração da enzima foi realizada por meio da adição de 2 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) a 4° C e o extrato centrifugado a 6.700 g, por 10 min. O sobrenadante obtido foi armazenado a 4° C para determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas totais presentes nas amostras. Em uma cubeta de vidro, com capacidade de 3 mL, foram adicionados 2,9 mL de tampão de reação [306 µL de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL de guaiacol e 86,5 mL de tampão de fosfato 0,01 M (pH 6,0)] a 0,1 mL do extrato proteico (sobrenadante). A reação foi conduzida durante 5 min, com as leituras de absorbância tomadas a cada 20 s, iniciando-se logo após a adição do extrato ao substrato. A atividade das peroxidases foi determinada a 30° C por meio de método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1982) a 470 nm. A quantificação de proteínas totais presentes no extrato enzimático foi determinada utilizando-se o método proposto por BRADFORD (1976). Os valores foram expressos em Unidades de Absorbância (UA) a 470 nm/min/µg proteína (U.A./min/mg de proteína), para atividade específica, ou Unidades de Absorbância a U.A./min/grama peso fresco (g.p.f.), para a atividade geral.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Efeito *in vitro* do extrato bruto aquoso e do óleo essencial sobre *C. cassiicola***

Na avaliação das cinco concentrações do extrato de *A. millefolium* (Tabela 1), sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*, observou-se nas concentrações de 10, 20 e 25% que o crescimento micelial foi maior e significativamente diferente da testemunha. Nas demais concentrações de extrato bruto aquoso de 1 e 50% não houve diferenças significativas, em relação à testemunha. Os resultados desse trabalho demonstram que houve um estímulo no crescimento micelial do patógeno pelo extrato bruto aquoso da *A. millefolium*. Atribue-se isto ao fato das moléculas dos compostos antimicrobianos deste extrato (como o azuleno) terem sido inativadas pela elevação da temperatura durante o processo de autoclavagem, assim como a maior oferta de nutrientes no meio de cultura pode ter propiciado crescimento maior do patógeno nas placas com os tratamentos com os EBAs. FIORI *et al.* (2000) observaram que concentrações de 20 e 25% dos EBAs de *A. millefolium* poderiam ter se constituído em substrato, estimulando o crescimento do patógeno *Dydimella bryoniae*. Essa baixa

atividade antimicrobiana do extrato bruto de *A. millefolium* está de acordo com os resultados observados por USKINI *et al.* (1996), que relataram ausência da atividade dessa espécie quando usada como extrato aquoso de raízes frente a *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma* e *Streptomyces scabies*.

Em relação à esporulação e germinação de conídios dos tratamentos com EBA (Tabela 1), verificou-se que as concentrações testadas não apresentaram diferenças estatísticas em relação à testemunha sendo que elas estimularam estes eventos. Entretanto, OGBEBOR; ADEKUNLE (2005) observaram redução no crescimento micelial e na germinação de conídios de *C. cassiicola*, isolado de seringueira, quando na presença de concentrações de extrato bruto (10, 25, 50 e 100%) de *Ocimum basilicum* (manjeriço). Também observaram que outras plantas medicinais como *Ageratum conyzoides* (mentrasto), *Allium sativum* (alho) e *Portulaca oleraceae* (beldroega), entre outras, não apresentaram efeito inibitório sobre o fungo *C. cassiicola*. Já em relação ao OE, em todas as alíquotas utilizadas, houve redução no crescimento micelial de *C. cassiicola* (Tabela 2), estatisticamente diferente da testemunha sendo que a maior inibição foi na presença de 200 µL do óleo essencial.

Tabela 1 - Efeito do extrato bruto aquoso (EBA) de *Achillea millefolium* na esporulação e na germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* de pepino.

Tratamento	Esporulação /cm <sup>2</sup>	Germinação %	Inibição %	Crescimento micelial /cm	Crescimento médio/cm
EB 1%	60,33 a	93,25 a	0	5,54 a	6,52 a
EB 5%	61,00 a	89,75 a	0	5,72 a	6,82 a
EB 10%	41,66 a	75,50 b	0	6,20 b	7,54 b
EB 20%	11,33 b	70,50 b	0	6,52 b	8,01 b
EB 25%	47,33 a	97,51 a	0	6,14 b	7,44 b
Testemunha	34,00 a	66,25 b		5,83 a	6,93 a
CV %	19,87	19,45		5,96	7,66

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Efeito de alíquotas de óleo essencial (OE) de *Achillea millefolium* no crescimento micelial, na esporulação e na germinação de conídios de *Corynespora cassiicola* de pepino.

Tratamento	Esporulação/cm <sup>2</sup>	Germinação %	Inibição %	Crescimento micelial/cm	Crescimento médio/cm
OE 20	52,50 a	52,50 a	20,75	4,82 b	0,51 b
OE 40	5,62 b	9,02 b	86,41	4,32 b	0,42 b
OE 60	6,55 b	7,75 b	88,30	4,01 b	0,39 b
OE 100	6,25 b	2,25 b	96,60	4,27 b	0,44 b
OE 200	0,00 b	1,25 b	98,11	3,42 b	0,32 b
Testemunha	35,00 a	64,53 a		6,44 a	0,70 a
CV %	29,39	33,32		16,94	22,33

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Em relação à esporulação e germinação de conídios, na presença de OE de *A. millefolium*, apenas a alíquota de 20 mL não diferiu da testemunha pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 2). Na presença das demais alíquotas observaram-se redução tanto na esporulação quanto na germinação dos conídios. O efeito fungitóxico do óleo essencial de *A. millefolium* também foi observado por FIORI *et al.* (2000) em *Didymella bryoniae* onde, na alíquota de 100 mL, encontraram inibição de 96% na germinação de conídios e, por microscopia eletrônica de varredura, observaram crescimento atípico e degeneração das hifas de *D. Bryoniae*. BONALDO *et al.* (2007) observaram que o óleo essencial de *Corymbia citriodora* (eucalipto), em todas as alíquotas testadas (5, 10, 20; 40 e 60 µL), inibiu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum sublineolum* e escleródios de *Sclerotium rolfsii*.

### Controle *in vivo* de mancha de corinespora em pepino "japonês"

A severidade da doença, avaliada sete dias após as inoculações nas primeiras e segundas folhas, mostrou que houve redução na área foliar lesionada (afl) em função direta do aumento nas concentrações do extrato bruto aquoso de *A. millefolium* (Fig. 1). Os extratos aquosos brutos a 1%, 10% e 25% diferiram estatisticamente entre si quando utilizados no intervalo de quatro dias (T1), dois dias (T2) e (T3) antes da inoculação com o patógeno *C. cassiicola*. A partir da concentração de 10%, nos T2 e T3, os extratos reduziram significativamente a severidade nas folhas que haviam recebido diretamente esses extratos apresentando efeito local. No tempo de aplicação T1, as áreas lesionadas foram intensas, apresentando as maiores médias nesse tratamento. Os trata-

mentos EBA 1%, no T3, EBA 10%, no T1 e o tratamento testemunha positiva também não diferiram estatisticamente, apresentando valores de severidade da doença de até 6% de afl. Mas os tratamentos EBA 1%, no T1 e no T2, e o tratamento *S. cerevisiae*, no T1 e no T2, apresentaram as maiores médias de áreas foliares lesionadas (afl). Em algumas plantas, foram verificados sintomas de alta agressividade, incluindo seca do limbo foliar e lesões cotiledonares. Folhas tratadas com EBA a 1% apresentaram lesões intensas de *C. cassiicola* e semelhantes entre si, nos dois primeiros tempos de aplicação do tratamento indutor (T1 e T2). Estatisticamente, observou-se que as médias entre os tratamentos com *S. cerevisiae* e EBA 1% foram similares entre os tempos de aplicação dos tratamentos (T1 e T2). Os tratamentos EBA a 25% aplicados a quatro (T1) e dois (T2) dias antes da inoculação, *S. cerevisiae* a quatro dias (T1) e EBA a 10% a dois (T2) e zero dias (T3) antes da inoculação, não diferiram estatisticamente entre si, apresentando severidade menores 3% (afl). A menor área lesionada foi encontrada no tratamento com EBA 25%, destacando-se o T3 de aplicação, onde foi constatada a inexistência de lesões. Esse, ainda, não diferiu estatisticamente do tratamento testemunha absoluta (sem inoculação), apresentando um controle muito próximo a um controle total. Nos tempos T2 e T1, foi verificada a presença de poucos "fleks" (pontuações cloróticas). Embora os tratamentos EBA 25%, nos intervalos de T1 e T2, tenham diferido do EBA 25%, no T3 eles mostraram-se promissores para o controle da doença, pois apresentaram valores inferiores a 1%, como relatado anteriormente, possivelmente, pelo efeito direto do extrato bruto aquoso de *A. millefolium* nas plantas de pepino. A indução de resistência não pode ser descartada, pois os mecanismos de defesa podem ser rapidamente ativados.

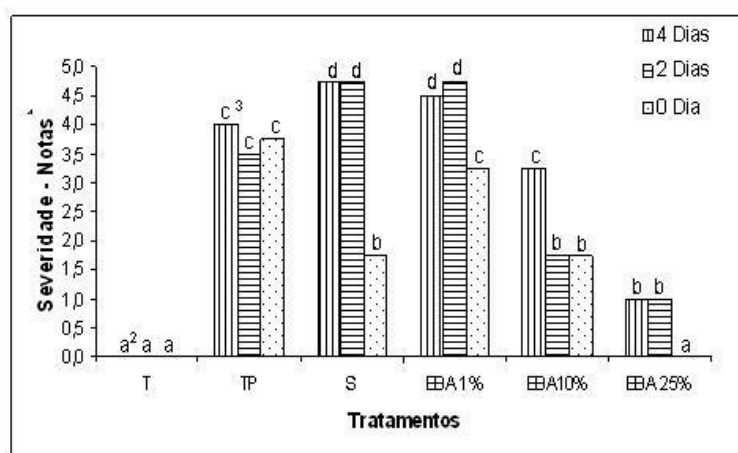


Fig. 1 - Severidade de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) em plantas de pepino, sete dias após a inoculação. Plantas tratadas com extrato bruto aquoso (EBA) de *Achillea millefolium* aos quatro dias, dois dias e zero dias antes da inoculação. <sup>1</sup>Escala de notas: 0 = ausência de sintomas; 1 = < 1% de área foliar lesionada (afl); 2 = 1% a 3% de afl; 3 = 3,1% a 6% de afl; 4 = 6,1% a 12% de afl; 5 = 12,1% de afl. <sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. <sup>3</sup>T- Testemunha Absoluta; TP- Testemunha Positiva (água+ fitopatógeno); S- *Saccharomyces cerevisiae*; EBA - Extratos Brutos Aquosos a 1%, 10% e 25%.

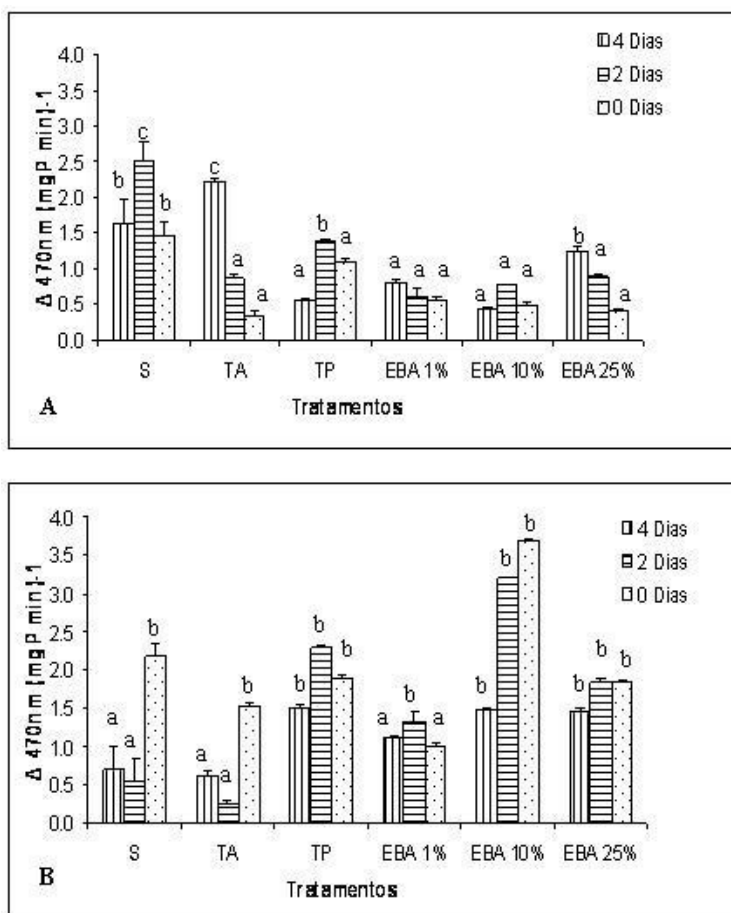


Fig. 2 - Atividade específica de peroxidase em plantas de pepino na segunda folha verdadeira tratadas aos quatro dias, dois dias antes (A), após (B) e concomitantemente com a inoculação de *Corynespora cassiicola* (A). As barras representam o desvio padrão da média ( $\pm$ ) de quatro repetições. TA- Testemunha Absoluta; TP- Testemunha Positiva (água + fitopatígeno); S- *Saccharomyces cerevisiae* (controle); EBA- Extrato Bruto Aquoso a 1, 10 e 25%. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Entre os tratamentos 1, 10 e 25% de EBA, ficaram evidentes as relações inversas de quantidade de lesões, de acordo com o aumento da concentração do extrato bruto aquoso aplicado. O fato de o tratamento mais efetivo e mais direto ter sido o EBA 25% pode indicar um efeito de dose dependente das concentrações de EBA. A redução da área foliar lesionada pode constituir-se em um dos principais efeitos da resistência induzida (BELL, 1981, citado por STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994).

A atividade de peroxidase, de um modo geral, não pode ser correlacionada com a área foliar lesionada, em nenhum dos tratamentos aplicados (Fig. 2). Possivelmente a atividade desta enzima é detectada nas primeiras horas após a aplicação dos eliciadores e, neste caso, como as dosagens foram realizadas a partir de 48h não se pode detectar a ativação enzimática. Entretanto, pode-se observar que após a inoculação houve incremento na atividade de peroxidase principalmente em plantas tratadas com EBA 10% aos 2 e 0 dias, embora não se tenha observa-

do diferenças significativas. Quando comparado com a testemunha positiva (água + fitopatígeno) observase incrementos de aproximadamente 25 e 42% na atividade da enzima, aos 2 e zero dias, respectivamente em plantas tratadas com EBA 10%.

PEREIRA *et al.* (2008) avaliaram a eficiência de extratos de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil (ASM) no manejo de cercosporiose em cafeeiro e observaram picos de atividade da peroxidase aos 2 e 11; 7 e 11 e 2 e 9 dias após a aplicação dos tratamentos, respectivamente. Já em folhas de tomateiro, as análises bioquímicas realizadas mostraram que as peroxidases não são bons marcadores de resistência, pois não houve diferenças no acúmulo dessas enzimas entre plantas tratadas com ASM (acibenzolar-S-metil), indutor de resistência altamente eficiente sobre o controle da bacteriose *Xanthomonas vesicatoria* (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004). De acordo com SCHNEIDER; ULLRICH (1994), alguns indutores de resistência em pepino não elevam o nível de peroxidases na magnitude da proteção induzida, a exemplo do

que ocorreu em plantas tratadas com extratos de *Reynoutria sachalinensis*. No trabalho de DI PIERO; PASCHOLATI (2004) constatou-se que vários indutores bióticos e abióticos elevaram as atividades das peroxidases como também de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, em plantas de pepino, mas sem haver relação entre o aumento da atividade de uma enzima em particular e a indução de resistência, o que reforça a hipótese de que a resistência é um processo multicomponente. ROTH *et al.* (2000) demonstraram que a aplicação de extrato aquoso de *Lychnis viscaria* em plantas de pepino induziu aumento da atividade de até 20% da peroxidase, 30% de quitinase e 68% de  $\beta$ -1,3-glucanase, concluindo que o extrato da planta induz mecanismos bioquímicos de resistência. No presente artigo, a ausência da atividade de peroxidases pode ter sido em função do intervalo do tempo de avaliação (2 e 4 dias). Estudos futuros devem ser conduzidos utilizando-se diferentes tempos de amostragens (coleta) e dosagens da enzima peroxidase em intervalos menores de tempo (a partir de 6h, por exemplo).

## CONCLUSÕES

O óleo essencial de *A. millefolium* apresenta efeito inibitório, *in vitro*, principalmente na esporulação de *C. cassiicola* e o extrato aquoso, a 25%, controla a doença sugerindo a utilização desta planta como possível fungicida natural para o controle deste fitopatógeno em pepino. Porém, estudos ainda devem ser conduzidos para verificar o potencial indutor destes subprodutos de *A. millefolium*.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M.R.; YAMASHITA, J. Efeito da técnica de inoculação de *Corynespora cassiicola* (Bert. & Curt.) Wei na reação de três cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, v.3, p.55-58, 1978.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica*, v.33, p.383-387, 2007.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, v.32, p.21-83, 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: Wiley, 1990. 532p.
- COSTA, A.F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v.1, 1031p.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. *Summa Phytopathologica*, v.30, n.2, p.243-250, 2004.
- DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C., PRABHU, A.S. Uma nova enfermidade foliar do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Bert. & Curt) Wei. *Fitopatologia Brasileira*, v.3, p.259-265, 1978.
- FERREIRA, D.F. *Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 66p.
- FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, v.148, p.483-487, 2000.
- GENEROSO, E.C.S.; KONRAD, M.; HERNANDEZ, F.B.T.; PAPA, M.F.S. Ocorrência de fungos patogênicos na aceroleira irrigada, no município de Junqueirópolis, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA – CONBEA, 31., 2002, Salvador. Resumos. 1 CD ROM.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUÆ, J. Association of enhance peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.20, p.73-82, 1982.
- OGBEBOR, N.; ADEKUNLE, A.T. Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology*, v.4, p.996-1000, 2005.
- PEREIRA, R.B.; ALVES, E.; RIBEIRO JUNIOR, P.M., RESENDE, M.L.V.; LUCAS, G.C.; FERREIRA, J.B. 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.
- REGENTE, M.C.; OLIVA, C.R.; FFELDMAN, M.L.; CASTAGNARO, A.P.; CANAL, L. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiologia Plantarum*, v.100, n.1, p.178-182, 1997.
- ROTH, U., FRIEBE, A., SCHNABL, H. Resistance induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lychnis viscaria* L. *Journal of Biosciences*, v.55, n.7, p.365-367, 2000.

- SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiological and molecular Plant Pathology*, v.45, p.291-304, 1994.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-SUZUKI, C.C.L.; ITAKO, A.T. Utilização de extratos vegetais no controle de doenças de plantas. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). *Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: panorama atual e perspectivas na agricultura*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. Cap. 6, 308p.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica*, v.20, n.1, p.16-21, 1994.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.11, p.16-29, 1999.
- USKINI, J.; HAYAKAWA, Y.; TADANO, T. Medicinal plants for suppressing soil-borne plant diseases. Screening for medicinal plants with antimicrobial activity in roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.42, p.423-426, 1996.
- VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B.; TESSMANN, D.J. Epidemias de mancha de *Corinespora* em pepino "tipo japonês" sob cultivo protegido na região norte do estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n.5, p.570, 2003.
- VIDA, J.B.; OLIVEIRA, R.R.; TESSMANN, D.J.; VERZIGNASSI, J.R.; COSTA, H. A agricultura protegida: Plasticultura-Hortaliça-Manejo de doenças. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). *Cultivo em ambiente protegido – histórico, tecnologia e perspectivas*. Viçosa: UFV, 2004. 332p. Cap. 8.

Recebido em 16/2/09

Aceito em 22/4/10