

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

ELOISA LORENZETTI

**CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* EM SOJA POR  
EXTRATO DE ALECRIM  
E ANÁLISE DOS MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

ELOISA LORENZETTI

**CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* EM SOJA POR  
EXTRATO DE ALECRIM  
E ANÁLISE DOS MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Coorientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

L869c	<p>Lorenzetti, Eloisa Controle de <i>Macrophomina phaseolina</i> em soja por extrato de alecrim e análise dos mecanismos de defesa envolvidos / Eloisa Lorenzetti. – Marechal Cândido Rondon, 2017. 47 f.</p> <p>Orientador: Dr. José Renato Stangarlin Coorientador: Dr. Odair José Kuhn</p> <p>Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2017.</p> <p>1. Soja – Doenças e pragas. 2. <i>Macrophomina phaseolina</i>. 3. Homeopatia. I. Stangarlin, José Renato. II. Kuhn, Odair José. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 633.34 CIP-NBR 12899</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



## ELOÍSA LORENZETTI

Controle de *Macrophomina phaseolina* em soja por extrato de alecrim e análise dos mecanismos de defesa envolvidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Odair José Kühn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Roberto Luís Portz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Marechal Cândido Rondon, 10 de fevereiro de 2017

*À Deus e  
Aos meus pais Élide Maria Lorenzetti e Antônio Lorenzetti.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela benção, força, luz e coragem para enfrentar os obstáculos da vida.

Agradeço ao meu pai Antônio Lorenzetti, minha mãe Élide Maria Lorenzetti, minha irmã Elizana Lorenzetti Treib, e meu noivo Juliano Tartaro que são tudo de mais precioso que tenho, e que além de todo amor, compreensão, companhia, e incentivo, me apoiaram e nunca mediram esforços para me auxiliar.

Ao meu orientador Professor Dr. José Renato Stangarlin meu agradecimento especial, pela excelente orientação, pelo incentivo, pelos ensinamentos, paciência, pelo exemplo de profissionalismo, e pelas palavras sábias nos momentos difíceis.

Ao Professor Dr. Odair José Kuhn pela coorientação, ensinamentos, paciência, auxílio e pelos sábios conselhos.

Ao professor Roberto Portz por ter permitido o uso do laboratório da UFPR *Campus Palotina*, pelos ensinamentos e imensa ajuda.

Ao professor Dr. Edmar Soares de Vasconcelos, por me ensinar a usar o programa estatístico GENES.

Ao professor Dr. Claudio Tsutsumi, por me auxiliar inúmeras vezes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelos ensinamentos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso.

Aos funcionários da UNIOESTE, em especial ao Sr. Edelberto e Sr. Antônio, que além de abrirem os laboratórios se preocupavam comigo.

Aos funcionários do cultivo protegido, Lauro e Flávio, pela disponibilidade sempre que eu precisava.

Aos amigos Lívia Hoepers, Jeferson Carvalho, Eliana Peliçon Pereira, Cristiani Belmonte, Jessica Coppo, Itamar Ferreira, Nicanor Henkemeier, Danielle Mattei, Claudia Prado dos Santos, Alfredo Alves Neto, pela amizade sincera, e em especial aos amigos Anderson Luiz Heling e Cristiane Claudia Meinerz por me ajudarem muitas vezes em tudo que precisava e por tirarem tempo para me ensinar técnicas.

Aos companheiros do grupo COBALFI.

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior– CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma participaram da realização deste estudo.

Muito obrigada!

## RESUMO

LORENZETTI, Eloisa. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Fevereiro de 2017. **Controle de *Macrophomina phaseolina* em soja por extrato de alecrim e análise dos mecanismos de defesa envolvidos.** Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Coorientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn.

Diversos trabalhos utilizando extratos obtidos de plantas medicinais têm demonstrado ação antimicrobiana direta e potencial de induzir o acúmulo de metabólitos secundários, sendo estes muito importantes nos principais mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método alternativo através da utilização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), nas concentrações 0%, 1%, 2,5% e 5%, para verificar a atividade antimicrobiana contra *Macrophomina phaseolina*, controlar a podridão cinzenta da haste em soja e determinar as atividades de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e teor de proteína de plantas de soja tratadas. Foram realizados ensaios *in vitro* a fim de analisar o crescimento micelial do fungo, a massa do fungo e o número de micro-escleródios, ensaios *in vivo* em casa de vegetação para avaliar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), além de análises bioquímicas para verificar uma possível indução de resistência nas plantas tratadas. Para determinação das enzimas de defesa, plantas de soja foram tratadas com os extratos e inoculadas com *M. phaseolina*, sendo retiradas amostras para análise nos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 h após o tratamento. O extrato de alecrim reduziu em até 44% e 74% o crescimento fúngico em meios sólido e líquido, respectivamente, enquanto que para micro-escleródios a redução foi de 61%. Para AACPD, no primeiro e no segundo ensaios houve redução de 53% e 56% respectivamente. Nas amostras retiradas do colo das plantas, para peroxidase, as concentrações mais elevadas do extrato proporcionaram dois picos de indução. Houve constante incremento na atividade de polifenoloxidase desde 36 até 120 h após o tratamento para a concentração 5% do extrato de alecrim. Para FAL apenas a concentração 5% promoveu incremento 83% e 130% maior nos tempos 168 e 216 h após o tratamento, respectivamente. Para as atividades na raiz, a peroxidase novamente apresentou dois picos de incremento para a concentração 5% do extrato, a polifenoloxidase foi 426% maior na concentração 5% às 216 h após o tratamento e a atividade de FAL apresentou incremento de 340% no tempo 216 h após o tratamento com 5% do extrato. Estes resultados indicam potencial do extrato de alecrim no controle de podridão cinzenta da haste em soja e na indução da atividade de enzimas de defesa em colo e raiz de soja.

Palavras-chave: Fenilalanina amônia-liase. *Glycine max*. Indução de resistência. *Macrophomina phaseolina*. Peroxidase. Podridão carvão da soja. Polifenoloxidase. *Rosmarinus officinalis*.

## ABSTRACT

LORENZETTI, Eloisa. Western Paraná State University - UNIOESTE. February 2017. ***Macrophomina phaseolina* control in soybean by rosemary extract and defense mechanisms involved.** Advisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Coadvisor: Prof. Dr. Odair Jose Kuhn.

Several works using extracts obtained from medicinal plants have demonstrated direct and potential antimicrobial action to induce the accumulation of secondary metabolites, which are very important as plant defense mechanisms against pathogens. The objective of this work was to develop an alternative method using rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) at concentrations 0%, 1%, 2.5% and 5%, to verify the antimicrobial activity against *Macrophomina phaseolina*, control of charcoal rot in soybean stem and determine the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and protein content on soybean plants. We performed *in vitro* assays in order to analyze mycelial growth of the fungus, fungus mass and number of micro-sclerotia, greenhouse tests to evaluate the area under the disease progress curve (AUDPC), and biochemical analyzes to verify a possible induction of resistance in the treated plants. For the determination of the defense enzymes, soybean plants were treated with the extracts and inoculated with *M. phaseolina*. Samples were collected at 0, 36, 72, 120, 168, 216 and 264 h after treatment. The rosemary extract reduced by 44% and 74% the fungal growth on solid and liquid media, respectively, while for the micro-sclerotia the reduction was of 61%. For the AUDPC in the first and in second assays, there were a reduction of 53% and 56% respectively in the disease. For the samples collected at the base of stem, peroxidase had the highest concentrations of the extract with two peaks of induction. The polyphenol oxidase activity increased from 36 to 120 hours after treatment with extract at 5%. PAL activity was induced only with 5% extract, with increases 83% and 130% higher in times 168 and 216 hours after treatment, respectively. For enzymes activities in root, peroxidase again showed two peaks for increase at 5% concentration, polyphenol oxidase was 426% higher at 216 hours after treatment and PAL showed an increase of 340% at 216 hours after treatment with 5% extract. These results indicate potential of rosemary extract in the control of charcoal rot in soybean and in the induction of plant defense enzymes in soybean.

Keywords: *Glycine max.* Induction of resistance. *Macrophomina phaseolina*. Peroxidase. Phenylalanine ammonia-lyase. Polyphenol. *Rosmarinus officinalis*. Soybean charcoal rot.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ARTIGO I.....</b>	<b>5</b>
FUNGITOXIDADE DE EXTRATO DE ALECRIM SOBRE <i>Macrophomina phaseolina</i> E CONTROLE DE PODRIDÃO CINZENTA DA HASTE EM SOJA....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	10
Conclusões.....	16
Referências.....	16
<b>3 ARTIGO II.....</b>	<b>20</b>
INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM SOJA TRATADA COM EXTRATO DE ALECRIM.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	26
Conclusão.....	37
Referências.....	37
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*) é uma planta anual, de caule ereto, pertencente à família das leguminosas, sendo considerada a principal oleaginosa cultivada no mundo. Sua expectativa de produção mundial para a safra 2016/2017 é de 336,09 milhões de toneladas, sendo os principais produtores Estados Unidos, Brasil e Argentina. Em 2017 a estimativa é que, ocupando a segunda posição, o Brasil seja responsável por uma produção acima de 102,5 milhões de toneladas, perdendo apenas para os Estados Unidos (CONAB, 2016).

Com o passar dos anos e com o aumento da área de soja cultivada, promoveu o surgimento de doenças que começaram a prejudicar a produtividade, sendo uma das mais importantes a podridão cinzenta da haste, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, que infecta a raiz e a parte inferior do caule da planta, apresentando ocorrência generalizada nos solos cultiváveis do Brasil. Devido aos elevados danos causados pela doença, faz-se necessário o seu controle. O método mais prático e econômico seria a resistência genética, porém, não há cultivares comerciais resistentes a esse fungo, mesmo já tendo sido identificados genótipos moderadamente resistentes (ALMEIDA et al., 2014).

A rotação de culturas também é uma alternativa, porém questionável, uma vez que este fungo é polífago e capaz de sobreviver e se multiplicar em restos de cultura, além de que em muitas regiões, em função da estrutura das propriedades, a rotação de cultura se torna uma prática inviável (GODOY et al., 2005), assim, métodos alternativos de controle seriam uma opção.

Os métodos alternativos de agricultura são considerados modernos, desenvolvidos em sofisticado e complexo sistema de técnicas agronômicas, cujo objetivo principal não é a exploração econômica imediatista e inconsequente, mas sim, a exploração econômica em longo prazo, mantendo o agroecossistema estável e autossustentável (CARNEIRO et al., 2011).

A agricultura alternativa está sendo estudada com o intuito de buscar novas medidas de proteção das plantas contra doenças (CARNEIRO et al., 2011). Diversos trabalhos utilizando extratos e óleo essencial obtidos de plantas medicinais, têm demonstrado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (GARCIA et al., 2012) como é o caso do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (MAIA et al., 2014).

O alecrim é uma planta nativa do mediterrâneo pertencente à Família Lamiaceae (MAY et al., 2010) e apresenta inúmeros compostos como pineno, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora, diterpenos, ácidos orgânicos saponina, traços de alcaloides, princípios amargos, taninos e ácido rosmarínico (TESKE; TRENTINI, 1997).

A atividade antimicrobiana de *R. officinalis* foi observada por Soyly et al. (2006) no desenvolvimento *in vitro* de *Phytophthora infestans* onde ocorreu a inibição total do patógeno por contato direto e pela ação de compostos voláteis na redução da formação de esporângios e alterações na morfologia das hifas e dos vacúolos do fungo. Da mesma forma, Díaz Dellavalle et al. (2011) utilizando extratos de *R. officinalis* verificaram inibição do crescimento micelial de *Alternaria* spp..

O potencial de alecrim para controle de patógenos também tem sido verificado em diversos patossistemas, como *Pseudocercospora vitis* e *Plasmopara viticola* em videira (MAIA et al., 2014), *Alternaria solani* em soja (MENEZES et al., 2009), *Cladosporium fulvum* em tomateiro (ITAKO et al., 2009), *Ralstonia solanacearum* em pimentão (MARTINS et al., 2010), *Meloidogyne javanica* em soja (MATTEI et al., 2014) e *Meloidogyne incognita* em soja (MÜLLER et al., 2016).

Os vegetais respondem ao ataque de patógenos ativando seus mecanismos de defesa (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). As plantas se defendem utilizando arsenal estrutural, os quais agem como barreiras físicas não permitindo que o patógeno penetre na planta, e por reações bioquímicas que protegem as células e tecidos produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições para inibir seu crescimento (AGRIOS, 2005).

Estes mecanismos de defesa podem ser pré-formados, que já estão presentes nas plantas antes do contato com os patógenos, ou pós-formados que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Estes mecanismos induzíveis são ativados no momento em que a planta hospedeira reconhece os sinais emitidos pelo patógeno (PASCHOLATI, 2011).

A resistência pré-formada é o principal mecanismo em se tratando de resistência não específica, onde os vegetais realizam a síntese de proteínas, peptídeos e metabólitos secundários, os quais restringem a infecção por patógenos (HEATH, 2000). No entanto, quando se trata de indução de resistência, os

mecanismos de defesa pós-formados, tem papel fundamental (STANGARLIN et al., 2011).

A indução de resistência em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa como fitoalexinas (CAVALCANTI et al., 2006) e enzimas importantes como peroxidase, polifenoloxidase e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) (PASCHOLATI, 2011), em resposta ao tratamento com agentes como acibenzolar-S-metil (CAVALCANTI et al., 2006), e extratos vegetais (MAZARO et al., 2008).

As proteínas-RP estão presentes nas plantas e são tóxicas aos patógenos. As plantas as produzem em baixas quantidades, porém, essa produção é ampliada após o ataque do patógeno ou estresses (AGRIOS, 2005) e é uma das principais estratégias de defesa das plantas aos patógenos com a função de proteção (EDREVA, 2005).

Segundo Stangarlin et al. (2011) as proteínas-RP podem ser induzidas na planta hospedeira em resposta à infecção por patógeno ou devido a estímulos abióticos. A ação dessas proteínas na resistência das plantas contra patógenos pode ser direto, quando ocorre a inibição do crescimento ou da germinação do patógeno, ou indireto, agindo na indução de resistência.

As peroxidases estão presentes em células vegetais, de animais e em microrganismos. Van Loon; Van Strien (1999) classificou-nas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) pertencentes a família PR-9. Essas enzimas são estudadas na indução de resistência por serem consideradas importantes nos processos de defesa (CAVALCANTI et al., 2005). Isso se dá pela participação dela na lignificação, suberização e metabolismo da parede celular (HIRAGA et al., 2001), assim como respostas de hipersensibilidade e produção de fitoalexinas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

A redução da severidade da doença está muito relacionada com o incremento na atividade dessa enzima (CAVALCANTI et al., 2005). Segundo Stangarlin et al. (2011) modificações na atividade das peroxidases têm sido correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diversos patossistemas.

A polifenoloxidase (PFO) agrupa um conjunto de enzimas presentes em diversas espécies de bactérias, fungos, algas e plantas, sendo abundantes em tecidos de plantas infectados por insetos ou patógenos e estão envolvidas nos mecanismos de defesa ou senescência (MAYER, 2006), no processo de escurecimento de alimentos, e durante o processamento e armazenamento deles

(CARNEIRO et al., 2003). A atividade dessa enzima na resistência a doenças está na propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, sendo estas tóxicas para determinados microrganismos (AGRIOS, 2005).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) possui elevada importância no metabolismo secundário das plantas e por isso vem sendo estudada no fenômeno de indução de resistência (KUHN, 2007). A reação catalisada por esta enzima é importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2009), fitoalexinas e lignina, sendo sua atividade variável em função da parte da planta analisada (KALAIARASAN, 2009).

A FAL é responsável na desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, sendo o primeiro incorporado em diferentes compostos fenólicos presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). De acordo com Camm e Towers (1973) por ser muito sensível ao estado fisiológico das plantas e devido à grande variedade de estímulos, a atividade desta enzima pode variar muito, em pouco tempo.

Como um componente da resistência sistêmica induzida associado a maior capacidade de resposta das plantas tem-se o *priming*. Quando uma planta é induzida por algum elicitador antes ter contato com qualquer patógeno, a planta consegue reagir de forma mais rápida e eficiente quando o contato acontecer ativando as respostas de defesa celular (CONRATH, et al., 2002).

Diante disso, o presente estudo teve como principal objetivo desenvolver um método alternativo através da utilização do extrato de alecrim para controlar a podridão carvão causada por *M. phaseolina* em soja, além de verificar a atividade antimicrobiana desse extrato contra o patógeno e verificar a atividade das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase envolvidas neste processo.

## 2 ARTIGO I

**FUNGITOXIDADE DE EXTRATO DE ALECRIM SOBRE *Macrophomina phaseolina* E CONTROLE DE PODRIDÃO CINZENTA DA HASTE EM SOJA**

## **FUNGITOXIDADE DE EXTRATO DE ALECRIM SOBRE *Macrophomina phaseolina* E CONTROLE DE PODRIDÃO CINZENTA DA HASTE EM SOJA**

### **FUNGITOXICITY OF ROSEMARY EXTRACT ON *Macrophomina phaseolina* AND CONTROL OF CHARCOAL ROT IN SOYBEAN**

#### **Resumo**

A podridão cinzenta da haste ou podridão carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, é uma importante doença em soja, para a qual não há variedades resistentes ou fungicidas recomendados. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade antimicrobiana e avaliar o controle da podridão cinzenta da haste em soja com extrato aquoso de alecrim nas concentrações 0%, 1%, 2,5% e 5%. Foram realizados ensaios *in vitro* avaliando-se o crescimento micelial e produção de micro-escleródios em meios de cultivo sólidos e líquidos, bem como ensaios *in vivo* avaliando-se o progresso da doença. O extrato de alecrim reduziu em 44% e 74% o crescimento do fungo em meios sólidos e líquidos, respectivamente, enquanto que para micro-escleródios a redução foi de 61%. Para a área abaixo da curva de progresso da doença, no primeiro e no segundo testes, houve redução de 53% e 56%, respectivamente, na doença. Estes resultados indicam o potencial do extrato de alecrim no controle de podridão cinzenta da haste em soja.

**Palavras-chave:** Controle alternativo, *Glycine max*, *Rosmarinus officinalis* L.

#### **Abstract**

The charcoal rot caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* is an important disease in the soybean crop, for which there is no recommended fungicides or resistant varieties. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity and the control of charcoal rot in soybean stem with aqueous extract of rosemary at concentrations of 0%, 1%, 2.5% and 5%. The *in vitro* assays were carried out evaluating the mycelial growth and the production of micro-sclerotia in solid and liquid culture media, while *in vivo* assays were evaluated the progress of the disease. The rosemary extract reduced 44% and 74% the fungal growth on solid and liquid media, respectively, while for the micro-sclerotia the reduction was 61%.

For the area under the disease progress curve in the first and in second assays, there were a reduction of 53% and 56% respectively in the disease. These results indicate the potential of the rosemary extract for controlling charcoal rot in soybean.

**Key words:** Alternative control, *Glycine max*, *Rosmarinus officinalis* L.

## Introdução

A produção de soja é uma das atividades econômicas de crescimento muito expressivo e de elevada importância comercial. No Brasil a soja é o principal produto da agricultura, colocando o país entre os mais importantes do comércio agrícola mundial (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Entre os fatores que limitam a exploração máxima do potencial de produtividade da soja estão as doenças, como a podridão cinzenta da haste ou podridão de carvão causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, o qual é comumente encontrado em todas as áreas de cultivo da soja, visto que o fungo é um habitante natural dos solos. Esta doença causa problemas com apodrecimento de raízes e morte de plantas em anos em que ocorrem veranicos aliado a solos compactados e rasos, os quais não permitem adequada penetração das raízes (HENNING, 2009).

Ferreira et al. (1979) (apud ALMEIDA et al., 2014) realizaram o primeiro relato que apontou a *M. phaseolina* como causadora de expressivos danos à cultura da soja, onde constataram que em anos secos e quentes, na região norte do Paraná, os danos chegaram a atingir 50% da produção.

O controle desta doença é dificultado pelo fato de não existir controle químico nem variedades resistentes, assim, o controle fica restrito à rotação de cultura e ao manejo do solo, pois o estresse hídrico favorece a ocorrência da doença (HENNING, 2009).

Diante deste contexto, a utilização da indução de resistência poderia ser uma forma de controle através da utilização de extratos vegetais com propriedades eliciadoras de mecanismos de defesa vegetal (SCHWAN-ESTRADA et al., 2012). Além disso, algumas espécies de plantas possuem em sua composição substâncias que apresentam potencial fungicida contra patógenos de solo (GARCIA et al., 2012).

A planta medicinal *Rosmarinus officinalis* (alecrim) apresenta inúmeros compostos como pineno, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora, diterpenos, ácidos orgânicos saponina, traços de alcaloides, princípios amargos e taninos e ácido rosmarínico (TESKE; TRENTINI, 1997) sendo que algum desses compostos como o cineol, pineno, borneol e cânfora possuem atividade antimicrobiana conhecida (GACHKAR et al., 2007).

Extratos e óleos essenciais da planta medicinal *R. officinalis* tem sido efetivo para o controle de doenças em plantas, tanto de patógenos de parte aérea como *Alternaria solani* (MENEZES et al., 2009) e *Cladosporium fulvum* (ITAKO et al., 2009) em tomateiro, e bacterianos como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (VIGO et al., 2009) e *Ralstonia solanacearum* (MARTINS et al., 2010), quanto de patógenos veiculados pelo solo, como *Meloidogyne javanica* (MATTEI et al., 2014) e *Meloidogyne incognita* (MÜLLER et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana do extrato de alecrim contra *M. phaseolina* e controlar a podridão cinzenta da haste em soja.

## Material e Métodos

O isolado de *M. phaseolina* foi obtido a partir de raízes e caules de plantas de soja infectadas naturalmente. O fungo foi cultivado em placas de Petri com meio batata dextrose ágar (BDA) e conservado neste meio para posterior utilização.

Para a obtenção do extrato, folhas de alecrim foram trituradas com água destilada em liquidificador durante 2 minutos na proporção de 50 g de folhas para 450 mL de água destilada. Após, filtrou-se o extrato em peneira de 48 mesh e o bagaço retido nessa peneira foi prensado em pano e acrescentado ao extrato filtrado para melhor aproveitamento do mesmo. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 48 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 200 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira prensado em pano e acrescentado ao extrato filtrado. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 200 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 400 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira descartado e o extrato filtrado final coletado. O filtrado final obtido foi considerado como extrato de alecrim 10% que foi posteriormente diluído para 1%, 2,5% e 5% com água destilada.

Para a determinação da atividade antifúngica o extrato de *R. officinalis* nas concentrações indicadas foi incorporado ao meio de cultura BDA e após foi realizada a autoclavagem a 120 °C, 1 atm por 20 minutos. Foi adicionado no centro de cada

placa de Petri um disco de 1 cm de diâmetro segundo Lorenzetti et al. (2016). As placas permaneceram em temperatura de 25 °C e as medições diárias do diâmetro das colônias se iniciaram 24 h após a instalação do experimento e com os valores obtidos foi calculada a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) pela equação:

$$AACCM = \left[ \left[ \frac{(Y_1 + Y_{1+1})}{2} * I \right] + \left[ \left[ \frac{(Y_2 + Y_{2+1})}{2} * I \right] \dots \left[ \left[ \frac{(Y_n + Y_{n+1})}{2} * I \right] \right] \right]$$

Onde:

AACCM= área abaixo da curva de crescimento micelial (adimensional);

$Y_i$  e  $Y_{i+1}$ = Tamanho do micélio do fungo observado em duas avaliações consecutivas (cm);

$I$ = Intervalo entre duas avaliações consecutivas (dias).

Ao término do teste de inibição do crescimento micelial, avaliou-se o número de micro-escleródios de cada colônia a partir de uma amostra de micélio de 0,1 cm<sup>2</sup>.

Outro método que foi utilizado para a determinação da atividade antimicrobiana foi através da incorporação do extrato de alecrim, nas concentrações indicadas em meio líquido batata dextrose (BD). Após autoclavado durante 20 minutos a 120 °C e 1 atm, foram adicionadas ao meio três discos de 1 cm de diâmetro de micélio o fungo *M. phaseolina*. Os frascos permaneceram em agitação a 150 rpm a 25 °C por 10 dias, quando o conteúdo foi filtrado em papel 11 µm de diâmetro de poro. O micélio obtido foi seco em estufa a 50 °C por 24 horas e determinada a massa.

Para a avaliação do controle da podridão cinzenta em soja foram semeadas três sementes do cultivar 6563 IPRO. Os ensaios foram realizados em vasos plásticos com capacidade para 2 L contendo a mistura solo, areia e matéria orgânica na proporção de 2:1:1, esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm, durante 1 hora.

Quando as plantas apresentavam o primeiro trifólio totalmente expandido (estádio fenológico V2) foi realizado o tratamento no colo (região entre o solo e a inserção dos cotilédones) e na superfície do solo, utilizando borrifadores com extrato de alecrim nas concentrações 0%; 1%; 2,5% e 5%, aplicando-se aproximadamente 1 mL no colo e 2 mL no solo.

Três dias após o tratamento foi realizada a inoculação do patógeno com quatro discos de 1 cm de diâmetro retirados de colônias em meio BDA com 14 dias

de idade. Os discos foram colocados em contato com o colo e com as raízes próximas ao colo da planta. Após a inoculação, para manter a umidade necessária para que o fungo continuasse vivo, utilizou-se papel celofane, o qual foi cortado no formato circular do vaso e mantido sobre o solo durante 10 dias.

A severidade da doença foi avaliada através de medições do crescimento longitudinal da lesão na haste da planta a cada 2 dias, utilizando régua graduada em centímetros. Com os dados obtidos, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da equação proposta por Campbell e Madden (1990). Foram realizados dois ensaios para maior confiabilidade dos dados obtidos.

O delineamento experimental para os ensaios *in vitro* foi inteiramente casualizado, enquanto que para os *in vivo* foi em blocos casualizados. Ambos experimentos possuíram quatro tratamentos representados pelo extrato de *R. officinalis* nas concentrações 0%; 1%; 2,5% e 5%, com cinco repetições. A análise estatística foi realizada com o software livre Genes (CRUZ, 2013). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

## **Resultados e Discussão**

Para a atividade antimicrobiana em meio sólido observou-se inibição do crescimento micelial dependente da dose. Para AACCM, o extrato de alecrim apresentou efeito positivo reduzindo a AACCM, tendo seu comportamento representado por equação quadrática. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima é na concentração 4,5% do extrato de alecrim, onde se verifica a menor AACCM (Figura 1).

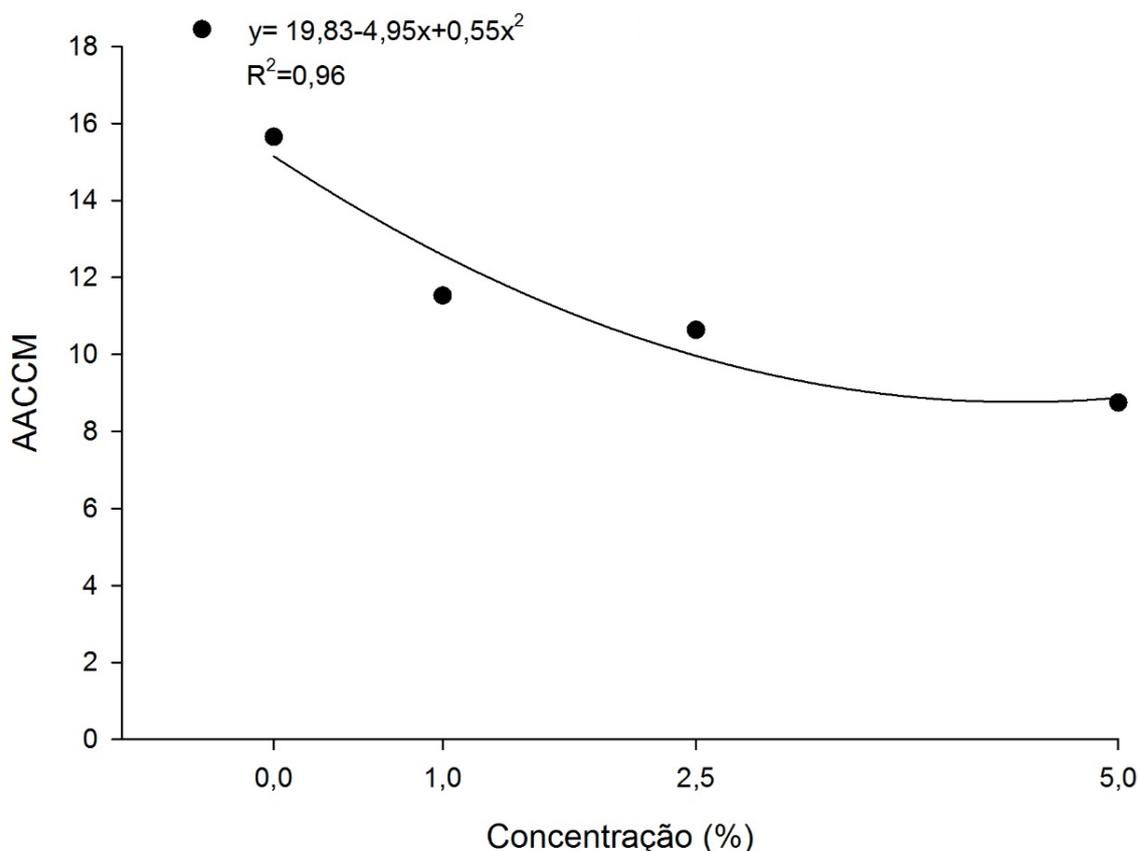


Figura 1 - Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultura sólido acrescido de diferentes doses de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) CV= 6,94%.

Este resultado é parecido com o encontrado por Goetten et al. (2014), que utilizou extrato bruto aquoso de alecrim nas concentrações 0, 10, 30 e 40% e observou inibição no desenvolvimento micelial do fungo *Sphaceloma ampelinum*, agente causador da antracnose da videira, com efeito dose-dependente.

Itako et al. (2009) também obtiveram efeitos significativos na inibição do crescimento micelial de *Cladosporium fulvum* utilizando extrato bruto aquoso de *R. officinalis* nas concentrações 20% e 40% observando redução da esporulação de 85,72% e 93,49% respectivamente, assim como Pereira et al. (2006), que utilizando óleo essencial de alecrim, verificaram a inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* e *Fusarium* sp..

Corroborando com esses resultados, Scapin et al. (2010), utilizando extrato bruto aquoso de *R. officinalis* nas concentrações 1%, 10%, 20% e 40%, encontraram em todas as concentrações testadas inibição do crescimento micelial de até 59%

para *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. O mesmo foi encontrado por Formentini et al. (2014) quando estudaram o efeito do extrato de alecrim sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

Inibição do crescimento fúngico foi relatada também por Camatti-Sartori et al. (2011) para *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. na presença de extrato acético de alecrim na concentração de 25%. Os autores observaram redução de 40% para *Fusarium* sp. e de 90% para *Botrytis* sp. Em trabalho realizado por Hillen et al. (2012) utilizando óleo essencial de alecrim, o crescimento micelial de *Alternaria carthami*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani* foram inibido em 100% a partir da concentração de 200 µL. Também utilizando o óleo essencial de alecrim, Nozaki et al. (1999) obtiveram resultados de inibição do crescimento micelial de *Alternaria* sp., *A. carthami* e *Sclerotium rolfsii*, chegando a inibição completa de *S. rolfsii* em alíquotas acima de 60 µL, e para o crescimento de *Alternaria* sp. inibição de 100% utilizando alíquotas acima de 200 µL. Segundo Rozwalka et al. (2008), o extrato aquoso de alecrim na concentração 10% inibe o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Esses resultados sustentam a hipótese de que o alecrim possui ação antimicrobiana podendo estar relacionado a compostos antifúngicos presentes em suas folhas como por exemplo o cineol, pineno, borneol e cânfora os quais possuem atividade antimicrobiana conhecida (GACHKAR et al., 2007).

Quanto à produção de micro-escleródios, houve efeito dose-dependente onde o ponto de mínima ocorreu na concentração 4,74% do extrato de alecrim, na qual o menor número de micro-escleródios (1622,86) foi encontrado (Figura 2).

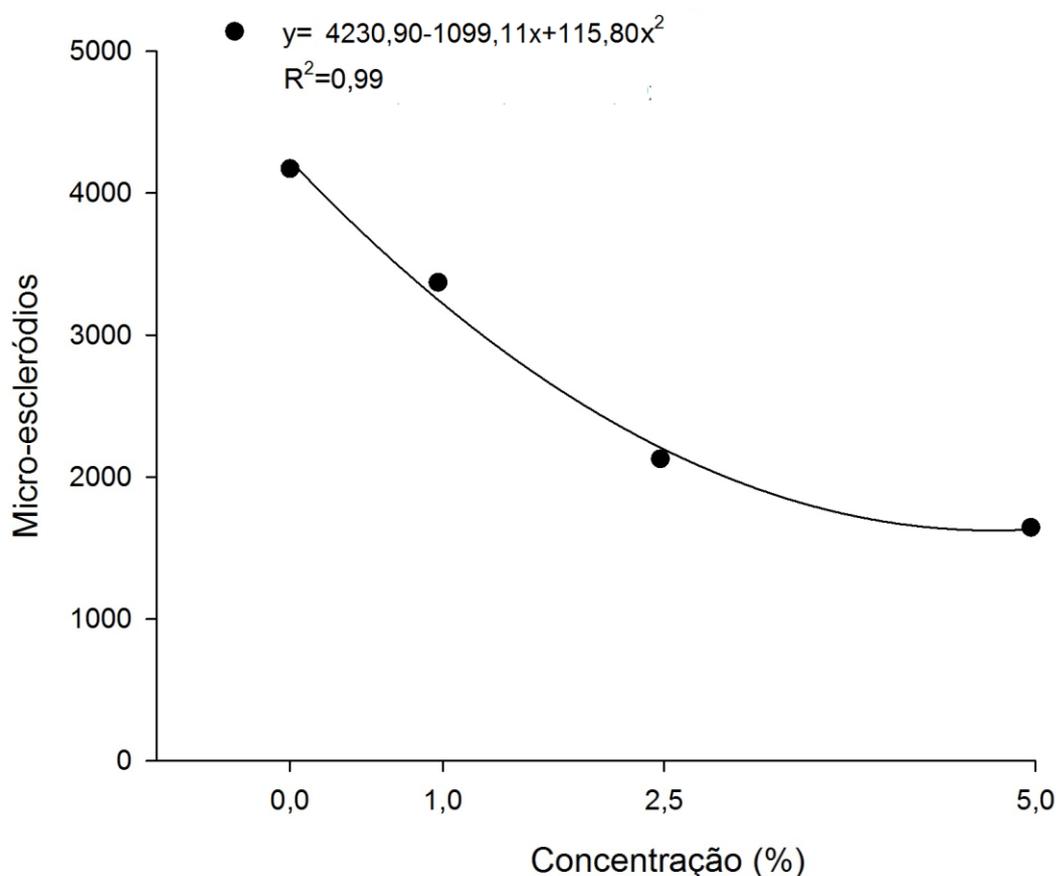


Figura 2 - Inibição *in vitro* da produção de micro-escleródios de *Macrophomina phaseolina* em função do tratamento com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) CV= 19,97%.

Embora os micro-escleródios não sejam esporos, ou seja, não sirvam primariamente para multiplicar e dispersar o fungo, são estruturas que *M. phaseolina* produz que, além de favorecerem sua sobrevivência em condições adversas, podem contribuir para sua disseminação, dada a grande quantidade em que são produzidos e pelo fato de germinarem produzindo hifas infectivas. Dessa forma, poderiam ser considerados secundariamente, em relação a esta última função, como propágulos assexuais (ALEXOPOULOS et al., 1996), e, portanto, a redução na sua produção, pode ter implicações epidemiológicas.

Alguns trabalhos indicam o efeito de alecrim na produção de esporos fúngicos. Itako et al. (2008), utilizando extrato de alecrim na concentração de 10%, observaram inibição de 78,9% da esporulação de *Alternaria solani*, assim como Itako et al. (2009) verificaram efeitos significativos na esporulação e germinação de

esporos de *Cladosporium fulvum* utilizando o extrato bruto aquoso de *R. officinalis*, observando reduções de 85,72% da esporulação, utilizando a concentração de 20% do extrato e redução de 93,49% da esporulação, utilizando a concentração de 40% do extrato de alecrim.

Para crescimento micelial de *M. phaseolina* em meio líquido, observou-se o mesmo comportamento que no meio sólido, representado por equação quadrática onde o ponto mínimo da equação encontra-se após a concentração mais alta avaliada (5% do extrato de alecrim), sendo assim entre as concentrações avaliadas, esta foi a que proporcionou a menor massa micelial (Figura 3).

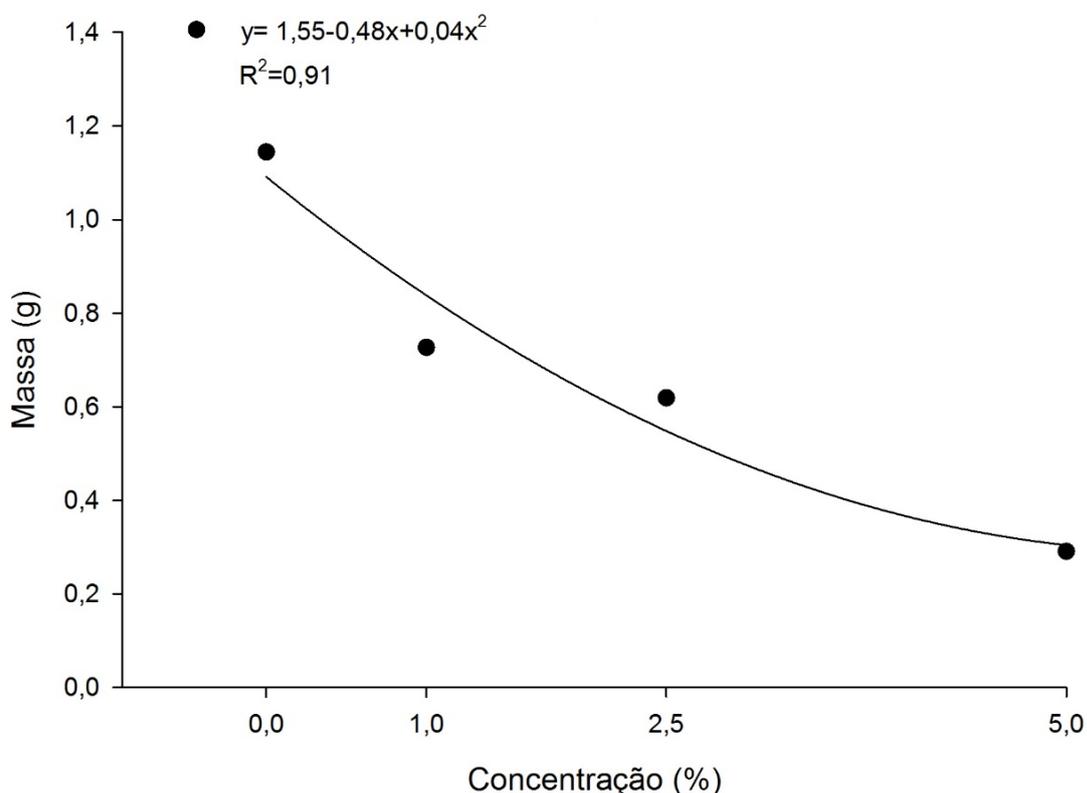


Figura 3 - Massa micelial de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultivo líquido acrescido de diferentes doses de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) CV= 28,70%.

Por estes dois ensaios de crescimento micelial observa-se que mesmo autoclavado, o extrato de alecrim ainda manteve atividade antifúngica, indicando a presença de compostos termoestáveis, como provavelmente, o próprio ácido rosmarínico, cujo ponto de fusão é de 175 °C (PAETERSEN; SIMMONDS, 2003), o

borneol que possui ponto de fusão de 208 °C (CONSTANTINO et al., 2004) e a canfora com ponto de fusão de 179 °C (SOUSA et al., 1998).

Brand et al. (2010) verificaram que o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* foi inibido pelo extrato de alecrim autoclavado, com redução de 19% para a concentração de 2,5%. Semelhantemente, Rozwalka et al. (2008) também verificaram que o extrato de alecrim autoclavado inibiu o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para avaliação da severidade em soja infectada com *M. phaseolina*, verificou-se que tanto no primeiro quanto no segundo ensaio o comportamento dos tratamentos foi representado por equação quadrática. No primeiro ensaio o ponto mínimo da equação foi encontrado na concentração de extrato de alecrim 4,26%, sendo a menor AACPD. Muito parecido com o segundo ensaio, onde o melhor controle foi na concentração do extrato de alecrim 5,27% (Figura 4).

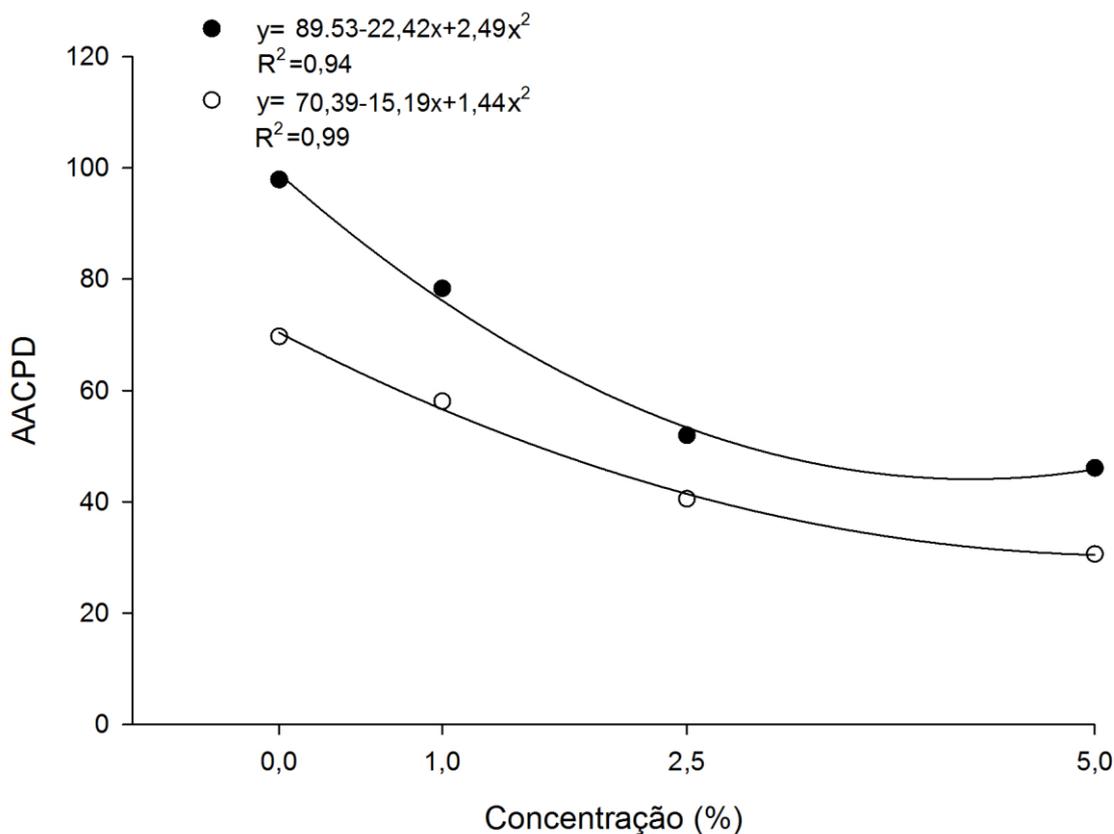


Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) podridão cinzenta da haste em plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com extrato de alecrim

(*Rosmarinus officinalis* L.). ● Primeiro ensaio CV= 16,08%. ○ Segundo ensaio CV= 22,24%.

A eficiência do extrato de alecrim na redução da severidade de doença também é relatada por outros autores como Roder et al. (2007), os quais observaram diminuição da incidência da podridão em morangos causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. quando utilizada a concentração 5% do extrato de alecrim. Itako et al. (2009) verificaram a capacidade protetora do extrato aquoso de alecrim contra a cladosporiose quando aplicado em tomateiro cultivado em casa de vegetação. Foi constatado pelos autores diminuição da quantidade de lesões nas folhas que foram tratadas com extrato aquoso de alecrim nas concentrações 10% e 20% quando comparado a testemunha.

Testando extrato bruto aquoso de *R. officinalis* na concentração de 20%, Becker et al. (2004) verificaram inibição do crescimento micelial de 42,8% do fitopatógeno *Cercospora kikuchii* isolado de plantas de soja. Estes autores concluíram que o extrato de alecrim oferece proteção em soja contra doenças causadas por *C. kikuchii*, *Septoria glycines* e *Microspora difusa* resultando no aumento da produtividade, sendo que o extrato de *R. officinalis* na concentração de 5% foi tão eficiente quanto o fungicida no controle de oídio.

Segundo Soyly et al. (2010), óleo essencial de alecrim demonstra efeito no controle de *Botrytis cinerea* em tomateiro e segundo Rozwalka et al. (2008) o extrato aquoso de alecrim na concentração 10% apresenta potencial de controle da antracnose em frutos de goiabeira.

Os extratos vegetais são importante fonte de substâncias biologicamente ativas. Além do extrato de alecrim ser um produto natural, sua eficiência no controle de *M. phaseolina* em casa de vegetação indica seu potencial uso na agricultura orgânica através da indução de resistência nas plantas de soja.

## **Conclusões**

O extrato de alecrim mostrou atividade fungitóxica direta contra *M. phaseolina*, representada pela redução no crescimento micelial e na produção de micro-escleródios de maneira dose-dependente. Além disso, o extrato de alecrim tem potencial para controlar a podridão cinzenta da haste em soja.

## Referências

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 868p.
- ALMEIDA, A.M.R. SEIXAS, C.D.S.; FARIAS, J.R.B.; OLIVEIRA, M.C.N; FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; COSTA, J.M.; GAUDÊNCIO, C.A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55p.
- BECKER, A.; VIGO-SCHULTZ, S.C.; STANGARLIN, J.R.; BALBI-PEÑA, M.I.; KLAHOLD, C.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29 (Suplemento), 2004. 163p.
- BRAND, S.C.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B; MILANESI, P.M.; SCHEREN, M.B.; ANTONELLO, L.M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1881-1887, 2010.
- CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F.E.; CRIPPA, L.B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R.T. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.6, n.2, p.117-122, 2011.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532p.
- CONSTANTINO, M.G.; DA SILVA, G.V.J.; DONATE, P.M. **Fundamentos de Química Experimental**, EDUSP, São Paulo, 2004. v.53. 262p.
- CRUZ, C.D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- FORMENTINI, M.A.; ALVES, L.F.A.; PINTO, F.G.S.; MAMPRIM, A.P. *In vitro* assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (*Clavicipitaceae*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.9, p.195-204, 2014.
- GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, Tehran, v.102, n.3, p.898-904, 2007.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.1, p.48-57, 2012.
- GOETTEN, M.R.; GOMES, B.R.; PIRES, A.F.; VACARI, J.; PIZZATTO, D.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; ITAKO A.T. Fungitoxicidade de extratos brutos aquosos

sobre *Sphaceloma ampelinum* da videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, p.118, 2014.

HENNING, A.A. **Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill)**. Informativo Abrates, v.19, n.3, p.9-12, 2009.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Documentos 349, Londrina: Embrapa Soja, 70p., 2014.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.3, p.241-244, 2008.

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

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J.R.; TREIB, E.L.; HELING, A.L.; COLTRO-RONCATO, S. CARVALHO, J.C.; HOEPERS, L.; RISSATO, B.B.; COPPO, J.C.; BELMONTE, C.; KUHN, O.J.; SILVA, I.F. Antimicrobial action against of *Macrophomina phaseolina* and control of the grey stem in soybean by homeopathic remedies *Nosode* and *Sulphur*. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v.11, n.36, p.3412-3417, 2016.

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.1, p.09-13, 2010.

MATTEI, D.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; BIELA, F.; ROLDI, M.; SILVA, T.R.B.; RAMPIM, L.; DADAZIO, T.S.; TAVARES-SILVA, C.A. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* in the control of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.2, p.469-476, 2014.

MENEZES, V.O.; PEDROSO, D.C.; DILL, A.M.; SANTOS, R.F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.4, n.2, p.1108-1112, 2009.

MÜLLER, M.A.; MIORANZA, T.M.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ISTCHUK, A.N.; FUCHS, F. *In vitro* toxicity and control of *Meloidogyne incognita* in soybean by rosemary extract. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, p.103-110, 2016.

NOZAKI, M.H.; HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; BERNARDO, R.; STANGARLIN, J.R. *Rosmarinus officinalis* no controle de fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, (Suplemento), 311p., 1999.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, Elsevier, v.62, p.121-125, 2003.

PEREIRA, M.C.; VIELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

RÖDER, C.; STANGARLIN, JR.; PAZUCH, D.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo de podridões de morango com tratamentos em pré-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32 (Suplemento), 201p., 2007.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SCAPIN, C.R; CARNELOSSI, P.R; VIEIRA, R.A; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; CRUZ, M.E.S. Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.1, p.57-61, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; BONALDO, S.M. Uso de extratos vegetais e cogumelos na indução de resistência de plantas. In: RODRIGUES, F. de Á.; FORTUNATO, A.A.; RESENDE, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**, Viçosa: Ed. da UFV, p.9-28, 2012.

SOUSA, J.S.I.; PEIXOTO, A.M.; TOLEDO, F.F. **Enciclopédia agrícola brasileira: C-D**. v.2, Piracicaba: Edusp, 1998. 608p.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.183-9, 2010.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium - Compêndio de Fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CÂMARA, 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**, Botucatu, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

### **3 ARTIGO II**

## **INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM SOJA TRATADA COM EXTRATO DE ALECRIM**

## INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DEFESA EM SOJA TRATADA COM EXTRATO DE ALECRIM

### INDUCTION OF RELATED DEFENSE PROTEIN IN SOYBEAN TREATED WITH ROSEMARY EXTRACT

#### Resumo

Extratos vegetais podem induzir mecanismos de resistência de plantas em função da presença de compostos com características eliciadoras. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de alecrim nas concentrações 0%; 1%; 2,5% e 5% sobre a atividade de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase (FAL) e teor de proteína de plantas de soja. Para determinação das enzimas de defesa, plantas de soja foram tratadas com os extratos e inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, sendo retiradas amostras para análise nos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 h após o tratamento. Nas amostras retiradas do colo das plantas, para peroxidase, as concentrações mais elevadas do extrato proporcionaram dois picos de indução. Houve constante incremento na atividade de polifenoloxidase desde 36 até 120 h após o tratamento para a concentração 5%. Para FAL apenas a concentração 5% promoveu incremento 83% e 130% maior nos tempos 168 e 216 h após o tratamento, respectivamente. Para as atividades na raiz, a peroxidase novamente apresentou dois picos de incremento para concentração 5%, a polifenoloxidase foi 426% maior na concentração 5% às 216 h após o tratamento e a atividade de FAL apresentou incremento de 340% no tempo 216 h após o tratamento com 5% do extrato. Estes resultados indicam o potencial do extrato de alecrim em induzir a atividade de enzimas de defesa em colo e raiz de soja.

**Palavras-chave:** Fenilalanina amônia-liase. Indução de resistência. Peroxidase. Polifenoloxidase.

#### Abstract

Plant extracts may exhibit induction of plant resistance mechanisms to elicitor compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of rosemary extract at

concentrations 0%; 1%; 2.5% and 5% on the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and protein content on soybean plants. To determine the defense enzymes, soybean plants were treated with extracts and inoculated with *Macrophomina phaseolina*. Samples were taken for analysis at 0, 36, 72, 120, 168, 216 and 264 hours after treatment. For the samples collected at the base of stem, peroxidase had the highest concentrations of the extract with two peaks of induction. The polyphenol oxidase activity increased from 36 to 120 hours after treatment for extract at 5%. PAL activity was induced only for 5% extract, with increases of 83% to 130% higher in times 168 and 216 hours after treatment, respectively. For enzymes activities in root, peroxidase again showed two peaks for increase at 5% concentration, polyphenol oxidase was 426% at 216 hours after treatment and PAL showed an increase of 340% at 216 hours after treatment with 5% extract. These results indicate the potential of rosemary extract to induce plant defense enzymes activities on soybean.

**Keywords:** *Glycine max.* Induction of resistance. Peroxidase. Polyphenol. Phenylalanine ammonia-lyase.

## Introdução

A soja, como as demais culturas, enfrenta problemas fitossanitários que podem comprometer a produtividade e a qualidade final do produto (JUHÁSZ et al., 2013). Dentre inúmeras doenças que acometem a cultura da soja tem-se a podridão cinzenta da haste ou podridão carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, capaz de sobreviver e se multiplicar em restos de cultura, afetando raízes e caule da soja e acarretando expressivas perdas econômicas (ALMEIDA et al., 2014).

A podridão cinzenta da haste ou podridão carvão é considerada uma doença de difícil controle visto que não existe controle químico nem cultivares resistentes a esse fungo (MENGISTU et al., 2011), e, por ser polífago, a rotação de cultura é uma prática de pouca eficiência (GODOY et al., 2005). Assim, justifica-se a utilização de métodos alternativos de controle, como o princípio da imunização através da indução de resistência.

A indução de resistência é a ativação dos mecanismos latentes de defesa das plantas contra patógenos, o que pode ocorrer pelo tratamento com moléculas

eliciadoras de origem biótica ou abiótica (PASCHOLATI, 2011). Dentre os mecanismos de defesa que podem ser ativados estão muitas enzimas, como peroxidase, envolvida nos processos de lignificação celular, polifenoloxidase que transforma fenóis em quinonas tóxicas aos microrganismos, e fenilalanina amônia-liase, enzima precursora da síntese dos fenilpropanóides envolvidos na defesa vegetal (STANGARLIN et al., 2011a).

Dentre os eliciadores utilizados na indução de resistência como prática de manejo de doenças, estão os extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, com eficácia comprovada para inúmeros patossistemas (STANGARLIN et al., 2011b).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta que pertence à Família Lamiaceae (MAY et al., 2010) e apresenta inúmeros compostos como pineno, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora, diterpenos, ácidos orgânicos saponina, traços de alcaloides, princípios amargos e taninos e ácido rosmarínico (TESKE; TRENTINI, 1997). O potencial de alecrim para controle de patógenos tem sido verificado em diversos patossistemas, como *Pseudocercospora vitis* e *Plasmopara viticola* em videira (MAIA et al., 2014), *Alternaria solani* em soja (MENEZES et al., 2009), *Cladosporium fulvum* em tomateiro (ITAKO et al., 2009), *Ralstonia solanacearum* em pimentão (MARTINS et al., 2010), *Meloidogyne javanica* em soja (MATTEI et al., 2014) e *Meloidogyne incognita* em soja (MÜLLER et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato de alecrim sobre a atividade de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e teor de proteína das plantas de soja tratadas com diferentes concentrações do extrato de alecrim e inoculadas com *Macrophomina phaseolina*.

## **Material e Métodos**

O isolado de *M. phaseolina* foi obtido a partir de raízes e hastes de plantas de soja infectadas naturalmente com a doença. O fungo foi cultivado em placas de Petri com meio batata, dextrose e ágar (BDA).

Para a obtenção do extrato, folhas frescas de alecrim foram trituradas com água destilada em liquidificador durante 2 minutos na proporção de 50 g de folhas para 450 mL de água destilada. Após, filtrou-se o extrato em peneira de 48 mesh e o bagaço retido nessa peneira foi prensado em pano e acrescido ao extrato filtrado para melhor aproveitamento do mesmo. O extrato aquoso obtido na filtração com a

peneira de 48 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 200 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira, prensado em pano e acrescentado ao extrato filtrado. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 200 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 400 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira descartado e o extrato filtrado final coletado. O filtrado final obtido foi considerado como extrato de alecrim 10% que foi posteriormente diluído para 1%, 2,5% e 5% com água destilada.

O ensaio foi realizado utilizando vasos plásticos com capacidade para 2 L contendo a mistura solo, areia e matéria orgânica na proporção de 2:1:1 (v/v/v), esterilizados em autoclave a 120 °C durante 1 h a 1 atm.

As sementes de soja utilizadas foram da cultivar 6563 PSF IPRO. Tais sementes foram semeadas a aproximadamente 2,5 cm de profundidade e após emergirem foi realizado o raleio, mantendo apenas três plantas de soja por vaso.

Quando as plantas apresentaram o primeiro trifólio totalmente expandido (estádio fenológico V2), foi realizado o tratamento das plantas no colo (região entre o solo e a inserção dos cotilédones) e no solo utilizando borrifadores com extrato de alecrim nas concentrações 0%; 1%; 2,5% e 5%. Foram pulverizados aproximadamente 1 mL no colo e 2 mL no solo.

Três dias (72 horas) após o tratamento foi realizada a inoculação do fungo *M. phaseolina*. A partir de uma placa de Petri contendo o fungo com 14 dias de idade, retirou-se quatro discos de 1 cm de diâmetro, que foram colocados em contato com o colo e as raízes próximas ao colo. Após a inoculação, para manter a umidade necessária para que o fungo continuasse vivo, utilizou-se papel celofane o qual foi cortado no formato circular do vaso e mantido sobre os mesmos por 10 dias.

A coleta das amostras do colo das plantas de soja foi realizada cortando 2 cm acima do solo e 1 cm abaixo do solo, totalizando uma amostra de 3 cm de colo. A coleta das amostras das raízes foi realizada cortando os 2 cm iniciais das raízes. Este processo foi realizado 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após o tratamento tanto para o colo quanto para raiz. Tais amostras foram lavadas em água corrente e imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congeladas a -20 °C.

Tanto as amostras de colo quanto as de raízes foram pesadas e posteriormente trituradas em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado. O homogeneizado foi centrifugado a 6.000g durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido, considerado como a

fração contendo as proteínas solúveis, o qual foi armazenado em micro tubos a -20 °C para posteriores análises bioquímicas.

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução continha 900 µL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL de guaiacol 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 100 µL de sobrenadante. A reação foi conduzida em espectrofotômetro a 470 nm pelo período de 2 minutos.

Para determinação da atividade das polifenoloxidasas foi utilizada a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O substrato para enzima consistiu de 110,1 mg de catecol diluído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0), formando uma solução de catecol 0,02 M. A reação se desenvolveu misturando 980 µL do substrato e 20 µL do sobrenadante. A temperatura de reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro a 420 nm pelo método direto durante 2 minutos. Os resultados obtidos foram expressos em absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada através da quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina segundo a metodologia descrita por Umesha (2006), onde acrescentou-se 50 µL do sobrenadante a 450 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Tal mistura foi incubada a 40 °C durante 2 h. Passadas as 2 h, foi adicionado 60 µL de HCl 5 M para cessar a reação e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase foi constituída através da diferença da absorvância da mistura contendo amostra e do controle (20 µL de extrato proteico e 980 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)).

O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL de sobrenadante e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL etanol; 125 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 250 mL de água destilada). Após o reagente ser adicionado sob agitação e as amostras serem incubadas por 5 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Para uma amostra foram formadas três réplicas. A absorvância foi plotada em curva padrão para de albumina de soro bovino.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro tratamentos, sendo eles o extrato de *R. officinalis* nas concentrações 0%; 1%; 2,5% e 5%, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com a testemunha 0% de extrato de alecrim (água) pelo teste Dunnett, a 5% de probabilidade de erro. A análise estatística foi realizada com o software livre Genes (CRUZ, 2013).

## Resultados e Discussão

Em relação a atividade de peroxidase no colo das plantas de soja tratadas com extrato de alecrim, as concentrações 1%, 2,5% e 5% incrementaram a atividade de peroxidase 36 horas após o tratamento. Posteriormente, nos tempos 72 e 120 horas todos os tratamentos não mantiveram diferença (Figura 1).

Porém, para as concentrações 2,5% e 5% houve um incremento acentuado 168 horas após o tratamento, incremento este que ficou em média 75,57% maior em relação ao controle. Desta forma, para estas concentrações do extrato verificou-se que houve dois picos de indução.

O primeiro pico, que ocorreu 36 horas após o tratamento, pode estar relacionado com o próprio efeito indutor do tratamento ou até mesmo a um efeito *priming*, pois não havendo a inoculação verifica-se que a atividade tendeu a voltar ao normal. Após a ocorrência da inoculação no tempo 72 horas após o tratamento e considerando que o fungo pode demorar alguns dias para iniciar o processo infeccioso, verificou-se a ocorrência do segundo pico de atividade. Este segundo pico pode estar relacionado não apenas ao processo infeccioso, mas principalmente ao processo de indução da resistência, já que a atividade foi verificada apenas para os tratamentos 2,5% e 5%, e não para a concentração 1% e nem para a concentração 0%, onde as plantas também passaram pelo processo de inoculação.

Dessa forma, com relação a peroxidase, para as duas concentrações mais altas do extrato de alecrim utilizadas, o processo parece ocorrer em dois picos, sendo um pico inicial que pode caracterizar um *priming* seguido de um pico mais acentuado que se manifesta após o início do processo infeccioso. Há trabalhos que mostram a ocorrência de um segundo pico de mecanismos de defesa ou compostos de sinalização após o estabelecimento efetivo do processo infeccioso, como é o caso do etileno. Este sinalizador pode apresentar dois picos de produção, ambos

após o início do processo infeccioso, mas sendo o segundo maior quando da colonização dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, momento em que vários mecanismos de defesa se expressam de maneira mais acentuada (PORTZ et al., 2011).

O tratamento com extrato de alecrim 1% demonstrou apenas um pico inicial no tempo 36 horas, com posterior atividade constante parecida com o controle água. Isso pode ter ocorrido devido ao fato desta concentração do extrato de alecrim ser muito baixa e, portanto, não conseguiu induzir a resistência da planta a ponto de elevar a atividade da enzima peroxidase após a inoculação do patógeno, não sendo eficiente no processo de indução.

Segundo Viecelli et al. (2010), a alteração na atividade de peroxidase é correlacionada a suscetibilidade ou resposta de resistência em diversos patossistemas. Esta enzima, segundo Resende et al. (2007), é responsável por catalisar a oxidação de álcoois fenólicos à lignina, fazendo com que ocorram mudanças na parede celular e proporcionando mais resistência contra as toxinas que são liberadas pelos patógenos. Alguns autores sustentam a hipótese de que as peroxidases não podem ser utilizadas nos estudos como marcador de resistências para certos patossistemas, já que a indução de resistência não está diretamente ligada a esta enzima. Boava et al. (2010) acreditam que a atividade de peroxidases relata alteração no metabolismo normal da planta e, portanto, promove mudanças até mesmo de outras enzimas que possuem rota metabólica em comum. Stangarlin et al. (2011a) acreditam que a mudança da atividade de peroxidases seja um indício de indução de resistência, já que as enzimas agem de forma preventiva, buscando impedir que o patógeno penetre a parede celular.

Segundo Formentini (2012), uma atividade mesmo que baixa ou uma atividade mais expressiva inicialmente, podem ter relação com a pré-disposição a resistência e, portanto, apresentarem uma maior expressão quando o patógeno inicia o processo infeccioso.

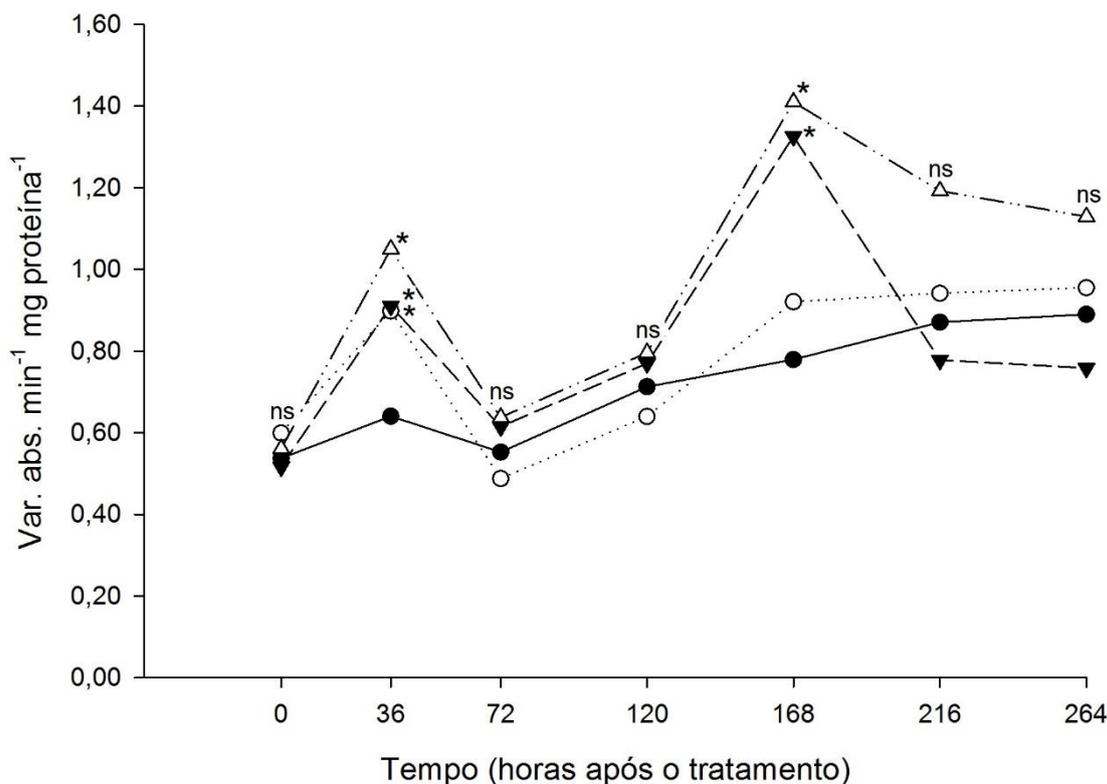


Figura 1 - Atividade de peroxidase em colo de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratados com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (.....○.....), 2,5% (---▼---) e 5% (-.-△.-.) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 33,01%, 2,42%, 18,98%, 5,94%, 10,11%, 18,38% e 19,79% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

Para a atividade de polifenoloxidase no colo, a concentração 5% do extrato de alecrim foi a única que promoveu incremento na atividade às 36 horas após o tratamento, bem como as 72 e 120 horas após o tratamento. Verifica-se que houve um incremento constante na atividade da enzima polifenoloxidase desde 36 até 120 horas após o tratamento. Observa-se uma atividade constante nos tempos 216 a 264 horas após o tratamento. Para a concentração 2,5% do extrato de alecrim, houve diferença significativa no tempo 168 horas após o tratamento com aumento na atividade da enzima 61,69% maior que o controle água. Este incremento pode estar relacionado ao próprio processo infeccioso diferentemente da concentração

5%, que sempre apresentou atividade relativamente alta nesses tempos de amostragem, com incremento de 37,45% no tempo 36 horas, 67,31% no tempo 72 horas, 67,65% no tempo 120 horas, 22,22% no tempo 216 horas e 42,91% no tempo 264 horas após o tratamento, todos comparados ao controle água (Figura 2).

Segundo Bonaldo et al. (2005), quando a planta reconhece uma molécula eliciadora rapidamente, ela consegue se proteger do patógeno com maior eficiência. Porém, neste estudo o aumento da atividade de polifenoloxidase começou mesmo após o tratamento, tendo este aumento acentuado após a inoculação do patógeno, portanto, o rápido reconhecimento poderia ter contribuído para estes aumentos. O aumento constante e precoce pode ser negativo para a planta, pois mesmo conseguindo retardar o processo infeccioso ou mesmo impedi-lo, em alguns casos o gasto metabólico envolvido faz com que a indução não seja vantajosa, já que a planta precisaria de muita energia, e talvez essa energia seria equivalente àquela gasta na presença do patógeno, não sendo, portanto, uma boa alternativa.

Comparando-se o resultado da enzima polifenoloxidase com a enzima peroxidase, não estaria havendo um evento inicial de *priming* e posteriormente um evento secundário onde ocorre o processo infeccioso, porém, tem-se um incremento de indução proporcionado pelo tratamento 5%, evento esse que se manteve durante todo o processo de amostragem. Isto não seria interessante em termos de controle da doença, porque mesmo na ausência da infecção nos tempos 36 e 72 horas após o tratamento a atividade continuou alta, o que gera um elevado custo metabólico para a planta.

Em trabalho realizado por Silva et al. (2003) utilizando *Bacillus cereus*, foi verificada alta atividade de peroxidase, sendo este aumento 10 vezes superior à atividade normal desta enzima. Isso demonstra que dependendo da interação pode-se observar resultados completamente distintos, assim como o encontrado neste trabalho comparando a atividade de peroxidase e de polifenoloxidase para o mesmo patossistema.

No caso deste trabalho, para polifenoloxidase no colo ocorreu uma elevação na atividade a partir da aplicação do tratamento, diferentemente do que ocorreu na atividade desta mesma enzima na raiz, onde se observou um pico inicial de incremento na atividade, com posterior volta a atividade normal e, novamente, um pico de atividade. Segundo Agrios (2005) a atividade de polifenoloxidase, na grande maioria dos casos, apresenta níveis mais elevados nos tecidos infectados. Isso

poderia justificar o fato desse aumento desmedido da atividade de polifenoloxidase no colo, visto que nesta região foi realizada a inoculação do patógeno e possivelmente tenha sido o local de início e maior ação por parte do patógeno.

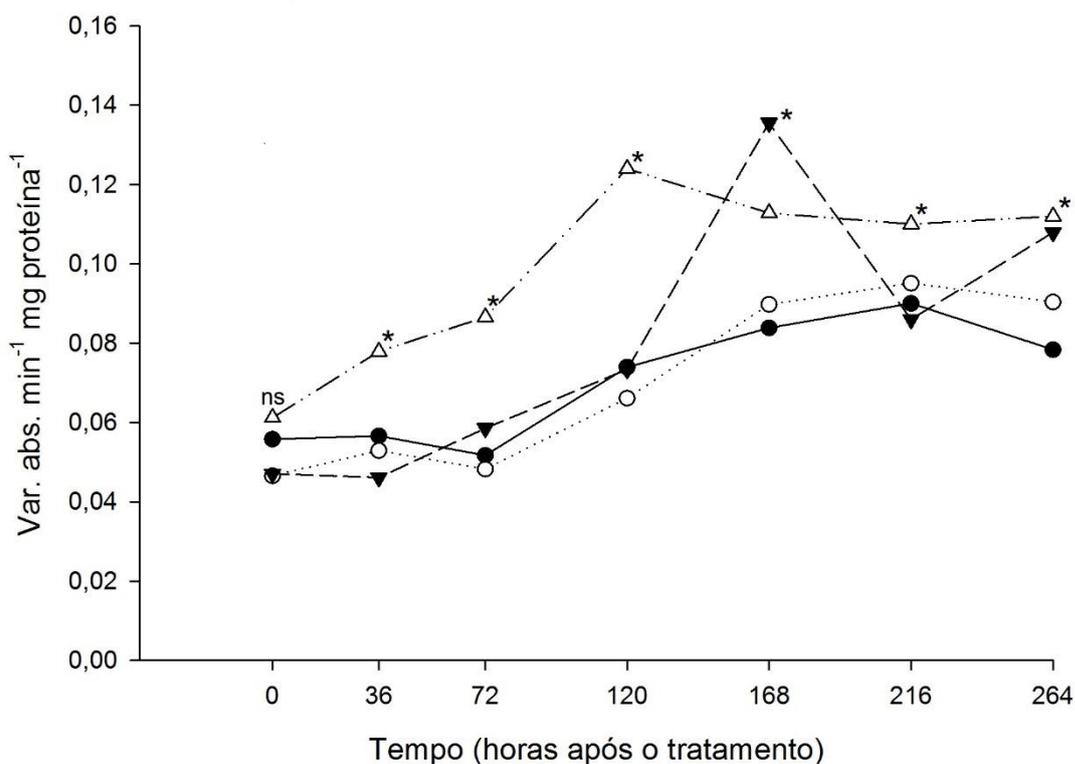


Figura 2 - Atividade de polifenoloxidase em colo de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratados com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (—○—), 2,5% (---▼---) e 5% (---△---) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 19,73%, 11,84%, 10,54%, 8,53%, 13,61%, 5,92% e 13,61% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

Em relação a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) no colo das plantas de soja tratadas com extrato de alecrim, a única concentração que promoveu incremento significativo na atividade desta enzima foi 5%, sendo este incremento 82,84% maior que o controle água no tempo 168 horas e 130,09% maior no tempo 216 horas após o tratamento (Figura 3).

Estes resultados demonstram que o extrato de alecrim para a atividade da enzima FAL atuou de maneira diferente que para a atividade da enzima peroxidase, pois não foi verificado para FAL o comportamento de *priming*, ou seja, não houve dois eventos de indução e sim apenas um pico que ocorreu depois da inoculação do patógeno. Provavelmente este incremento foi devido à colonização do patógeno e também devido a indução do tratamento na concentração 5% de extrato de alecrim, pois não foi verificado incremento na atividade nas demais concentrações testadas, nem no controle água, que também passou pelo processo de inoculação.

Resultados parecidos foram encontrados por Kuhn (2007) em feijoeiros tratados com *Bacillus cereus* e ASM, onde de acordo com o autor, isto pode significar que toda a rota dos fenilpropanóides não sofreu alterações.

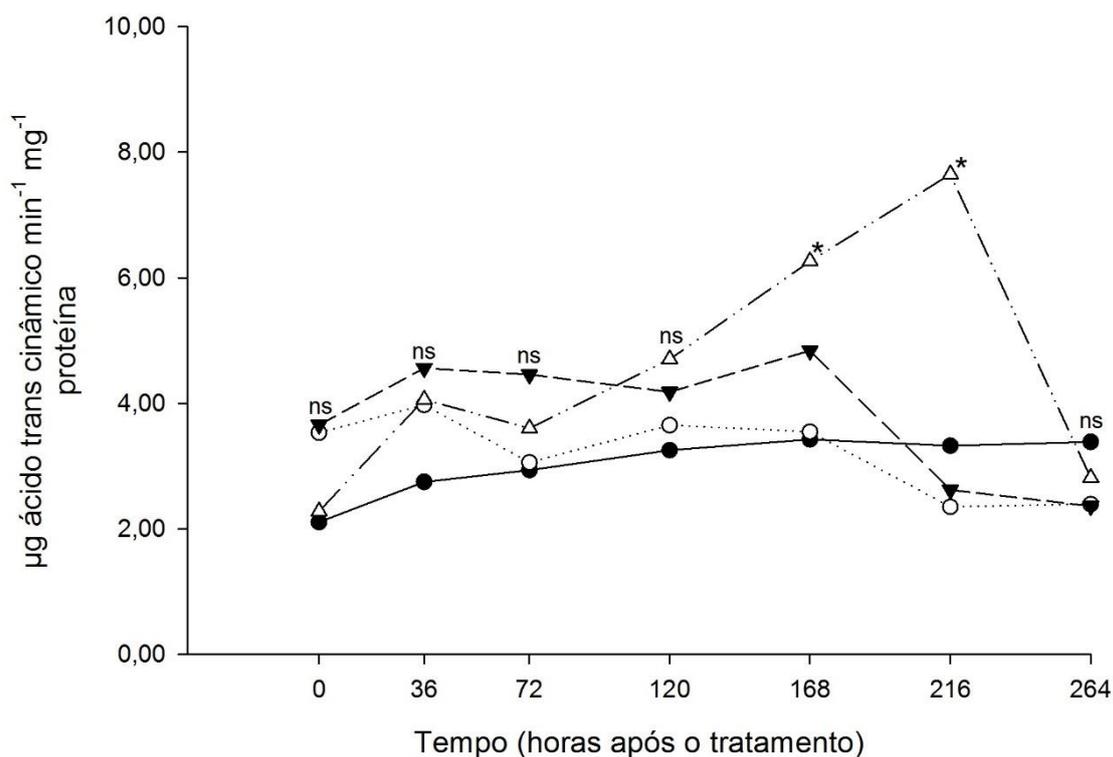


Figura 3 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em colo de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratadas com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (.....○.....), 2,5% (---▼---) e 5% (---△---) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 43,08%, 41,19%,

46,92%, 18,59%, 19,93%, 17,84% e 29,97% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

Para o tratamento alecrim 5%, o incremento da atividade da enzima peroxidase para a raiz ocorreu da mesma forma que no colo, ou seja, com a presença de dois picos, um período devido ao próprio tratamento às 36 horas após este, com incremento de 60% e um segundo período, cerca de 140% maior em relação ao controle. Este incremento pode ter ocorrido devido ao processo de indução, já que os demais tratamentos também foram inoculados (Figura 4).

Ao comparar a atividade de peroxidase para o colo e para a raiz observa-se que o segundo pico de indução ocorreu mais tarde nas amostras de raiz se comparado as amostras de colo. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que os tratamentos foram administrados no solo e na haste, assim, as amostras do colo receberam tratamento diretamente sobre a área amostrada o que pode ter contribuído para incremento dos resultados e da atividade de forma mais rápida.

Foi observado também um pico de atividade no tempo 120 horas após o tratamento, quando utilizado alecrim na concentração 2,5%. Para esta mesma enzima, nas amostras de colo, a concentração 2,5% apresentou dois picos de incremento na atividade, porém, na raiz, apenas um pico foi verificado no tempo 120 horas após o tratamento, onde o incremento foi de 83% se comparado ao controle.

Pelo fato do tratamento ter sido aplicado no solo e sobre o colo da planta, nas amostras de raiz, os tratamentos podem ter demorado mais para entrar em contato com as raízes, o que justifica o fato da presença de apenas um pico para esta concentração, além de que a concentração 2,5% do extrato de alecrim é teoricamente menos concentrada se comparado ao tratamento extrato de alecrim 5%, assim, por demorar a chegar até a raiz e talvez por ter chagado em pequena quantidade, isso justifique a presença de apenas um pico de indução.

Sabendo que as peroxidases atuam eliminando certos átomos de hidrogênio de grupos álcoois hidroxicinâmicos, os quais formam a lignina, e que somada a celulose e outros polissacarídeos atuam como barreira física para dificultar a penetração do patógeno (CAVALCANTI et al., 2005), sua alta atividade pode contribuir para dificultar o estabelecimento da doença já que influencia na entrada do patógeno.

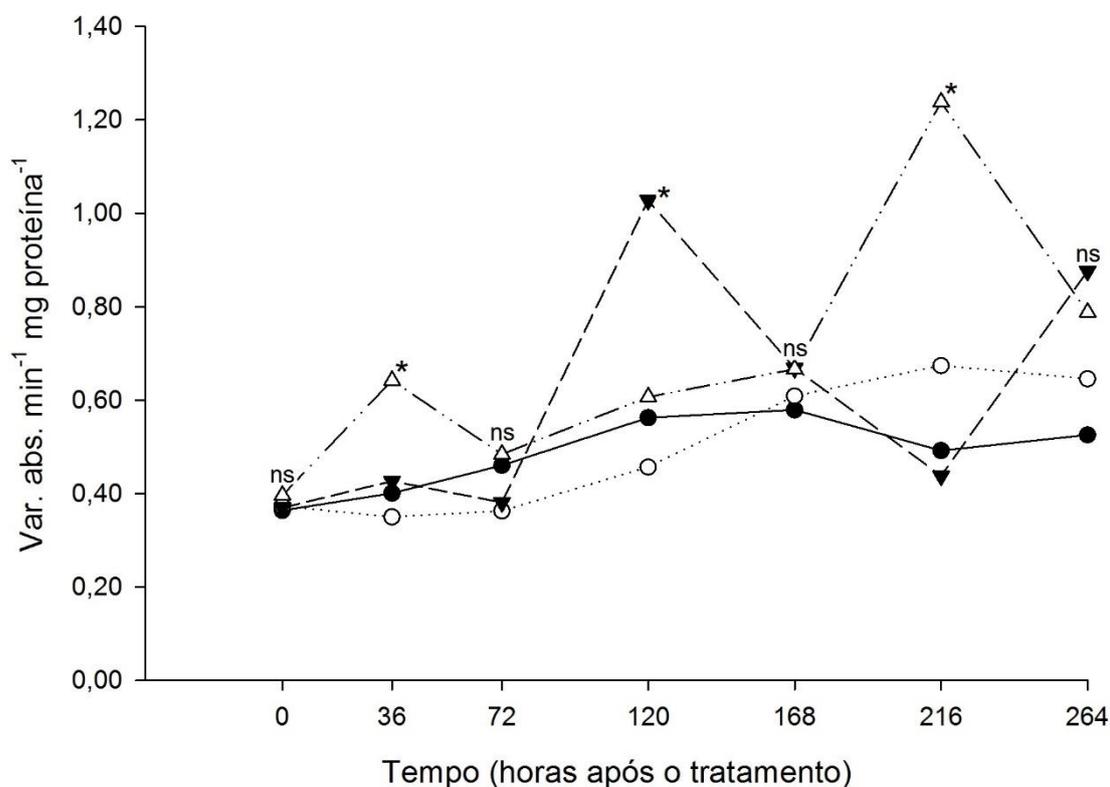


Figura 4 - Atividade de peroxidase em raízes de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratadas com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (.....○.....), 2,5% (---▼---) e 5% (---△---) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 16,26%, 16,90%, 24,19%, 20,87%, 20,01%, 12,06% e 22,17% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

Para a atividade da enzima polifenoloxidase em raízes de soja, observou-se que 36 horas após o tratamento, assim como ocorreu para a atividade dessa enzima no colo, houve o primeiro pico de atividade com o tratamento alecrim na concentração de 5% que se diferenciou do controle com valor cerca de 195% maior (Figura 5).

A atividade nos tempos 72, 120 e 168 horas após o tratamento manteve-se estável, não havendo diferença estatística quando comparados ao controle.

Assim como encontrado na atividade da enzima peroxidase no colo e na raiz, o extrato de alecrim na concentração 5% também demonstrou dois picos de indução. O primeiro pico ocorreu 36 horas após o tratamento e pode estar relacionado com o próprio efeito indutor do tratamento ou até mesmo a um efeito *priming*, já que não havia sido realizada a inoculação e porque a atividade nos tempos 72, 120 e 168 horas após o tratamento tendeu a voltar ao normal, não diferindo do controle.

Após a ocorrência da inoculação no tempo 72 horas após o tratamento e, levando em consideração que o fungo demora alguns dias para iniciar o processo infeccioso, foi verificado no tempo 216 horas após o tratamento a ocorrência do segundo pico, sendo este muito maior que o primeiro, demonstrando um incremento de 425,93% na atividade da enzima quando comparado ao controle água. Este segundo pico pode estar relacionado não apenas ao processo infeccioso em si, mas principalmente ao processo de indução de resistência, uma vez que os demais tratamentos e o controle também passaram pelo processo de inoculação, porém, não demonstraram atividade incrementada nas plantas.

O fato da concentração 5% do extrato de alecrim ter demonstrado aumento constante na atividade de polifenoloxidase no colo das plantas pode ter ocorrido porque a amostra retirada teve o tratamento administrado diretamente sobre ela (colo), o que elevou a atividade durante praticamente todo o processo de amostragem, demonstrando não ser uma opção no controle de doenças de plantas, pois gera elevado custo metabólico, fazendo com que a planta demande muita energia para controlar a doença. Em condições de campo, caso em uma lavoura a doença não ocorra e as plantas fossem tratadas, haveria um gasto metabólico desnecessário que implicaria em menor produtividade.

Segundo Romeiro e Garcia (2009), quando uma planta é exposta a um determinado eliciador de forma antecipada, ou seja, preventiva, seus tecidos demonstram reação mais rápida e eficiente quanto às tentativas de colonização do patógeno. Segundo Romeiro e Garcia (2009) isto seria um estado primário de indução da planta, ou seja, uma sensibilização ou um condicionamento da mesma. O contato entre o eliciador e a planta de forma precoce desencadearia, portanto, a síntese de algumas substâncias as quais se comportam como sinais bioquímicos, que podem dominar a planta, desencadeando um processo de indução, como observado para peroxidase em colo e em raiz e em polifenoloxidase para raiz, onde há um primeiro pico de indução e, posteriormente, picos que compreendem maior

atividade tanto por indução quanto pela colonização do patógeno, sendo, portanto, picos mais significativos que os primeiros.

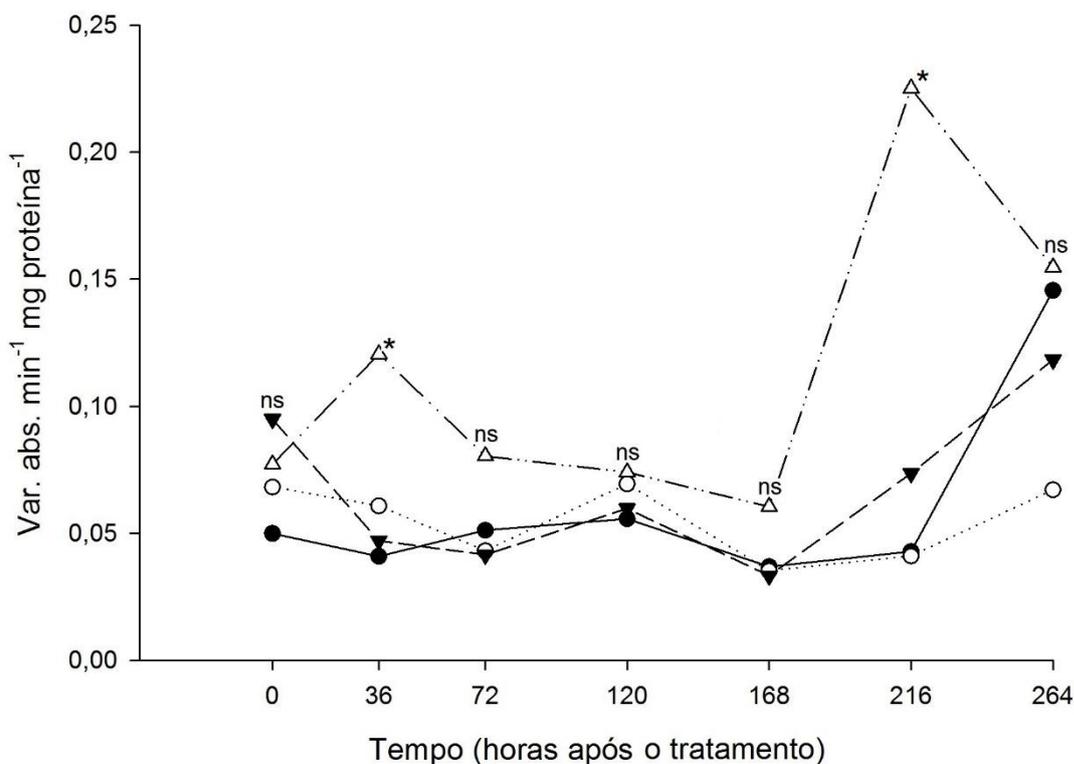


Figura 5 - Atividade de polifenoloxidase em raízes de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratadas com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (.....○.....), 2,5% (---▼---) e 5% (---△---) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 39,34%, 17,27%, 37,32%, 8,76%, 15,43%, 28,48% e 62,11% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

Quanto à atividade de FAL na raiz das plantas de soja tratadas com extrato de alecrim, assim como no colo, a concentração 5% de extrato de alecrim foi a única que promoveu incremento significativo na atividade desta enzima, sendo este aumento de 340,58% no tempo 216 horas após o tratamento. Para a atividade de FAL no colo, observou-se que esta aconteceu mais cedo quando comparada a raiz, e se manteve por dois tempos de amostragem (168 e 216 horas após o tratamento), diferentemente das amostras de raiz onde o incremento ocorreu apenas 216 horas após o tratamento, porém, o acréscimo foi superior ao do colo (Figura 6).

Provavelmente, a antecipação da indução ocorrida nas amostras de colo é devido ao fato de os tratamentos terem sido aplicados no colo e no solo, assim, no caso das amostras de colo, o tratamento foi diretamente sobre o colo, e no caso das amostras de raiz, os tratamentos foram no solo e entraram em contato com a raiz conforme se aproximavam delas.

Este pico da atividade da enzima deve estar relacionado ao processo infeccioso e também ao processo de indução da resistência, já que a atividade foi verificada apenas para a concentração 5% de extrato de alecrim, não sendo verificada nem para as demais concentrações nem para o controle água, sendo que também foram plantas inoculadas. Se essa indução fosse apenas relacionada à indução ou avanço da infecção, geraria também esse incremento nas plantas tratadas com água, o que não ocorreu.

Segundo Klessig e Malamy (1994), a atividade da enzima FAL produz precursores para a biossíntese de lignina e de outros compostos fenólicos, os quais se depositam como reação a infecção. Neste estudo, tanto para as amostras de colo quanto para as amostras de raiz não foi observado um pico de indução inicial assim como ocorreu para outras enzimas testadas, porém, observou-se que houve um pico de atividade dessa enzima após a inoculação, o qual não está relacionado apenas com o processo de colonização do patógeno, mas sim ao indutor, ou seja, seria uma atividade elevada devido a indução pelo extrato de alecrim 5%, visto que o mesmo não foi observado para os demais tratamentos ou para o controle, que também passaram pelo processo de indução.

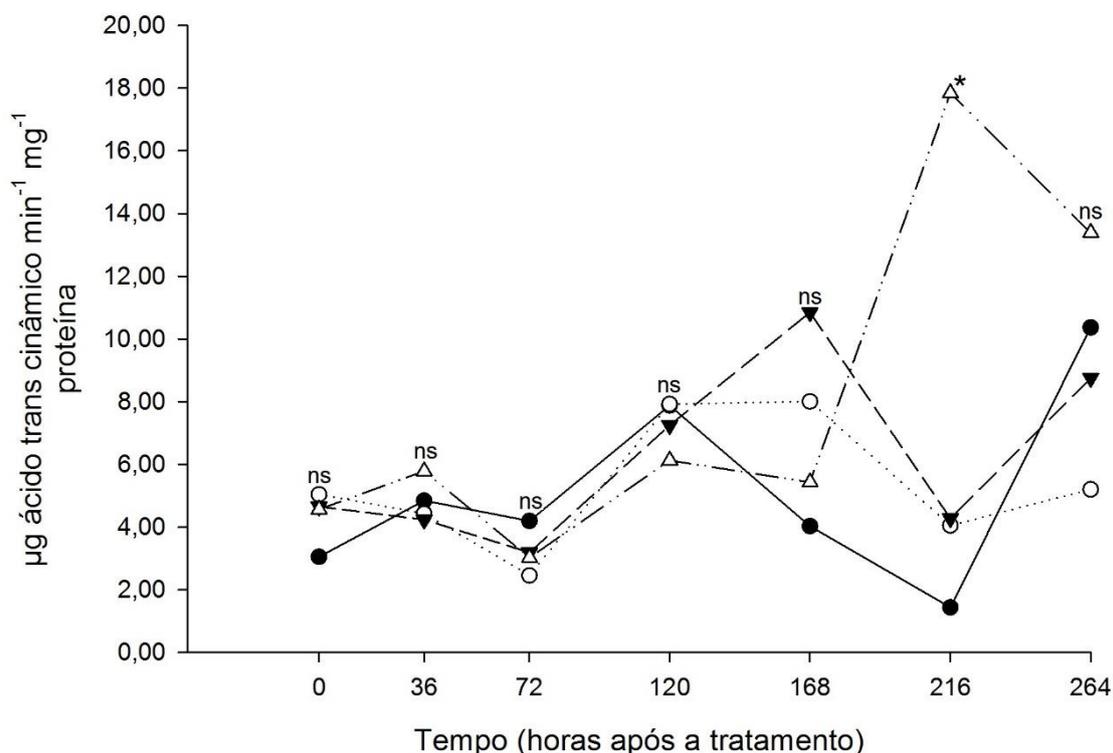


Figura 6 - Atividade de fenilalanina amônia liase em raízes de soja cujas hastes e solo do vaso de cultivo foram tratadas com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em concentrações de 1% (.....○.....), 2,5%(--▼--) e 5%(-.-△.-) e inoculado com *Macrophomina phaseolina*. Tratamento controle: água (—●—). O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação 72 horas após o mesmo. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de amostragem, pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada ao controle água. ns: não significativo. CV= 13,68%, 16,60%, 33,21%, 18,77%, 25,77%, 17,63% e 14,80% respectivamente aos tempos 0, 36, 72, 120, 168, 216 e 264 horas após tratamento.

## Conclusão

O extrato de alecrim foi capaz de induzir a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em colo e raiz de plantas de soja desafiadas com *M. phaseolina*, revelando a ação de eliciadores presentes neste extrato com efeito dose-dependente para a ativação desses mecanismos.

## Referências

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press. p.207-248, 2005.

ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S.; FARIAS, J.R.B.; OLIVEIRA, M.C.N; FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; COSTA, J.M.; GAUDÊNCIO, C.A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55p.

BOAVA, L. P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, p.168-172, 2010.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, p.11- 28, 2005.

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.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.81-124, 2005.

CRUZ, C.D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

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

FORMENTINI, H.M. **Avaliação de indutores de resistência biótico, abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. Tese (Doutorado em Agronomia). Marechal Cândido Rondon PR. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2012.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, p.657-675, 2005.

HAMMERSCHIMIDT, T.R.; NUCLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin. Springer, v.20, p.73-82, 1982.

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

JUHÁSZ, A.C.P.; PÁDUA, G.P.; WRUCK, D.S.M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N.R. Desafios fitossanitários para a produção de soja. Defesa vegetal e sustentabilidade do agronegócio. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.34, n.276, p.66-75, 2013.

KLESSIG, D.F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.26, p.1439-1458, 1994.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.

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

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.1, p.09-13, 2010.

MATTEI, D.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; BIELA, F.; ROLDI, M.; SILVA, T.R.B.; RAMPIM, L.; DADAZIO, T.S.; TAVARES-SILVA, C.A. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* in the control of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.2, p.469-476, 2014.

MAY, A. SUGUINO, E., MARTINS, A.N., BARATA, L.E.S., PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MENEZES, V.O.; PEDROSO, D.C.; DILL, A.M.; SANTOS, R.F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.4, n.2, p.1108-1112, 2009.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.A.; BOND, J.P.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J.; RUPE, J.B.; CHEN, P.; LITTLE, C.R.; CANADAY, C.H.; NEWMAN, M.A., PANTALONE, V.R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. **Plant Management Network**, Saint Paul, 2011. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2011/charcoal/>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

MÜLLER, M.A.; MIORANZA, T.M.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ISTCHUK, A.N.; FUCHS, F. *In vitro* toxicity and control of *Meloidogyne incognita* in soybean by rosemary extract. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, p.103-110, 2016.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.545-589, 2011.

PORTZ, R.L.; KOEHL, J.; FLEISCHMANN, F.; OßWALD, W. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. **Forest Pathology**, v.41, p.202-211, 2011.

RESENDE, M.L.V.; BARRETI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D. da; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.15, p.173-242, 2007.

ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Capítulo 6, p.85-100, 2009.

SILVA, M.B.C; CASTRO, N.F; CAVALCANTI, M.A. O Potencial biotecnológico de fungos que causam a podridão da madeira. In: 54º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. 3ª REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA. 2003, Belém - Ananindeua – Pará. **Anais...** Belém - Ananindeua – Pará: Universidade da Amazônia – Unama, 2003. CD-ROM.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.10, p.18-46, 2011a.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, p.1033-1042, 2011b.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium - Compêndio de Fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

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

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

## 4 CONCLUSÕES GERAIS

O extrato de alecrim mostrou uma atividade fungitóxica direta contra *M. phaseolina*, representada pela redução de 44% no crescimento micelial em meio sólido, com ponto de mínima na concentração 4,5% do extrato de alecrim e redução de 61% no número de micro-escleródios, com efeito dose-dependente, onde o ponto de mínima ocorreu na concentração 4,74% do extrato de alecrim. Para crescimento micelial de *M. phaseolina* em meio líquido a redução foi de 74% sendo o ponto de mínima da equação na concentração de 6% do extrato de alecrim, concentração esta que proporcionou a menor massa micelial.

Esses resultados apresentados podem ter sido verificados pela ação antimicrobiana do alecrim, o qual possui compostos antifúngicos como, por exemplo, cineol, pineno, borneol e cânfora, os quais possuem atividade antimicrobiana conhecida.

Para avaliação da severidade em soja infectada com *M. phaseolina*, no primeiro ensaio houve redução de 53% com ponto de mínima da equação na concentração de extrato de alecrim 4,26%. Para o segundo ensaio, a redução foi de 56% na doença, com ponto de mínima na concentração de alecrim 5,27%. Verificou-se assim, que o extrato de alecrim tem potencial para controlar a podridão cinzenta da haste em soja, podendo ser uma alternativa para os agricultores tanto na agricultura convencional quanto na orgânica.

Em relação a atividade de peroxidase no colo das plantas de soja tratadas, o extrato de alecrim nas concentrações 1%, 2,5% e 5% incrementaram a atividade às 36 horas após o tratamento. Para as concentrações 2,5% e 5% houve um incremento acentuado 168 horas após o tratamento, sendo em média 75,57% maior em relação ao controle. Houve, portanto, dois picos de indução, o primeiro relacionado com o próprio efeito indutor do tratamento ou até mesmo a um efeito *priming*, e o segundo relacionado ao processo infeccioso e, principalmente, ao processo de indução da resistência.

Para a atividade de polifenoloxidase no colo, a concentração 5% do extrato de alecrim foi a única que promoveu incremento na atividade às 36 horas após o tratamento, bem como as 72 e 120 horas após o tratamento. Esta concentração sempre apresentou atividade relativamente alta nesses tempos de amostragem, com

incremento de 37% no tempo 36 horas, 67% no tempo 72 horas, 68% no tempo 120 horas, 22% no tempo 216 horas e 43% no tempo 264 horas após o tratamento, todos comparados ao controle água.

Em relação a atividade de fenilalanina amônia-liase no colo, a única concentração que promoveu incremento significativo na atividade foi 5%, sendo este incremento 83% maior que o controle água no tempo 168 horas e 130% maior no tempo 216 horas após o tratamento.

A atividade de peroxidase para a raiz demonstrou incremento na concentração 5% do extrato de alecrim com presença de dois picos, um período devido ao próprio tratamento às 36 horas após este, com incremento de 60%, e um segundo período, cerca de 140% maior em relação ao controle.

Ao comparar a atividade de peroxidase para o colo e para a raiz observa-se que o segundo pico de indução ocorreu mais tarde nas amostras de raiz se comparado as amostras de colo, podendo ser devido ao fato de os tratamentos terem sido administrados no solo e na haste. Assim, as amostras do colo receberam tratamento diretamente sobre a área amostrada o que pode ter contribuído para incremento dos resultados e da atividade de forma mais rápida.

Para a atividade de polifenoloxidase em raízes às 36 horas após o tratamento houve o primeiro pico de atividade com o tratamento alecrim na concentração de 5% que se diferiu do controle com valor cerca de 195% maior.

Assim como encontrado na atividade da enzima peroxidase no colo e na raiz, o extrato de alecrim na concentração 5% demonstrou dois picos de indução. O fato da concentração 5% do extrato de alecrim ter demonstrado aumento constante na atividade de polifenoloxidase no colo das plantas pode ter ocorrido porque a amostra retirada teve o tratamento administrado diretamente sobre ela (colo), o que elevou a atividade durante praticamente todo o processo de amostragem, demonstrando não ser uma opção no controle de doenças de plantas, pois pode gerar elevado custo metabólico, fazendo com que a planta demande muita energia para controlar a doença. Em condições de campo, caso em uma lavoura a doença não ocorra e as plantas fossem tratadas, haveria um gasto metabólico desnecessário que implicaria em menor produtividade.

Quanto à atividade de FAL na raiz das plantas de soja tratadas com extrato de alecrim, assim como no colo, a concentração 5% de extrato de alecrim foi a única que promoveu incremento significativo na atividade desta enzima, sendo este

aumento de 341% no tempo 216 horas após o tratamento. Para a atividade de FAL no colo, observou-se que esta aconteceu mais cedo quando comparada a raiz, e se manteve por dois tempos de amostragem (168 e 216 horas após o tratamento), diferentemente das amostras de raiz onde o incremento ocorreu apenas 216 horas após o tratamento, porém, o acréscimo foi superior ao do colo. Provavelmente, a antecipação da indução ocorrida nas amostras de colo é devido ao fato de os tratamentos terem sido aplicados no colo e no solo, assim, no caso das amostras de colo, o tratamento foi diretamente sobre o colo, e no caso das amostras de raiz, os tratamentos foram no solo e entraram em contato com a raiz conforme se aproximavam delas.

Este estudo confirmou a atuação do extrato de alecrim na promoção da sanidade em plantas de soja. O extrato de alecrim foi capaz de induzir a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em colo e raiz de plantas de soja desafiadas com *M. phaseolina*, revelando a ação de eliciadores presentes neste extrato.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press. p.207-248, 2005.
- ALMEIDA, A.M.R. SEIXAS, C.D.S.; FARIAS, J.R.B.; OLIVEIRA, M.C.N; FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; COSTA, J.M.; GAUDÊNCIO, C.A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55p.
- CAMM, E.L.; TOWERS, G.H.N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, Elsevier, v.12, p.961-973, 1973.
- CARNEIRO, C.E.A; ROLIM, H.M.V; FERNANDES, K.F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de quariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá, v.25, p.189-193, 2003.
- CARNEIRO, S.M.T.P.; TEIXEIRA, M.Z.; NECHAR, R.M.C.; LONNI, A.A.; RODRIGUES, M.R; FILIPPSEN, L. **Homeopatia: princípios e aplicações na agroecologia**. Londrina: IAPAR, 2011.
- CAVALCANTI, F.R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.4, p.372-380, 2006.
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.81-124, 2005.
- CONAB – Companhia Nacional de abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos. **Monitoramento agrícola – Safra 2016/17**, v.4. Safra 2016/17, n.3. Terceiro Levantamento, 2016.
- CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant science**, Kidlington, v.7, p.210-216, 2002.
- DÍAZ DELLAVALLE, P.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; FERREIRA, F.; RIZZA, M.D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v.71, p.231-239, 2011.
- EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years, **General and Applied Plant Physiology**, Bulgaria, v.31, p.105-124, 2005.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.1, p.48-57, 2012.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, p.657-675, 2005.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1102-1156, 2000.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, n.4, p.315-319, 2000.

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

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

KALAIARASAN, P. Biochemical markers for identification of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistance in tomato. Karnataka **Journal of agricultural sciences**, Leicestershire, v.22, n.3, p.471-475, 2009.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.

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

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.1, p.09-13, 2010.

MATTEI, D.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; BIELA, F.; ROLDI, M.; SILVA, T.R.B.; RAMPIM, L.; DADAZIO, T.S.; TAVARES-SILVA, C.A. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* in the control of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.2, p.469-476, 2014.

MAY, A. SUGUINO, E., MARTINS, A.N., BARATA, L.E.S., PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em

função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, Elsevier, v.67, n.21, p.2318-2331, 2006.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MENEZES, V.O.; PEDROSO, D.C.; DILL, A.M.; SANTOS, R.F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.4, n.2, p.1108-1112, 2009.

MÜLLER, M.A.; MIORANZA, T.M.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ISTCHUK, A.N.; FUCHS, F. *In vitro* toxicity and control of *Meloidogyne incognita* in soybean by rosemary extract. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, p.103-110, 2016.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v.107, p.19-28, 1992.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.545-589, 2011.

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

SOYLU, E.M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, The Hague, v.161, p.119-128, 2006.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.10, p.18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal. Metabólitos secundários e defesa vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4ª ed., 2009. cap.13, p.342-372.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium - Compêndio de Fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant pathology**, Elsevier, v.55, p.85-97, 1999.