

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**DISSERTAÇÃO**

**Patogenicidade, Efeito da Temperatura no  
Desenvolvimento e Controle de Isolados de  
*Colletotrichum gloeosporioides*, Agente Causador da  
Antracnose da Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**

**Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E  
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**PATOGENICIDADE, EFEITO DA TEMPERATURA NO  
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE ISOLADOS DE  
*Colletotrichum gloeosporioides*, AGENTE CAUSADOR DA  
ANTRACNOSE DA JUÇARA (*Euterpe edulis* Mart.)**

**TATHIANNE PASTANA DE SOUSA POLTRONIERI**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Luís Antônio Siqueira de Azevedo**

*Co-orientação do Professor*  
**Jadier de Oliveira Cunha Junior**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração **Fitopatologia Aplicada**.

Seropédica, RJ  
Julho, 2012

571.92

P779p

T

Poltronieri, Tathianne Pastana de Sousa,  
1987-

Patogenicidade, efeito da temperatura no desenvolvimento e controle de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causador da antracnose da juçara (*Euterpe edulis* Mart.) / Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri - 2012.

85 f. : il.

Orientador: Luís Antônio Siqueira de Azevedo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Inclui bibliografia.

1. Fitopatologia - Teses. 2. Óleos vegetais - Teses. 3. Controle de temperatura - Teses. 4. Antracnose - Teses. I. Azevedo, Luís Antônio Siqueira de, 1955-. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA  
APLICADA**

**PATOGENICIDADE, EFEITO DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO E  
CONTROLE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*, AGENTE  
CAUSADOR DA ANTRACNOSE DA JUÇARA (*Euterpe edulis* Mart.)**

**TATHIANNE PASTANA DE SOUSA POLTRONIERI**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Fitopatologia Aplicada**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/07/2012

BANCA EXAMINADORA:

---

Luís Antônio Siqueira de Azevedo. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

João Pedro Pimentel. Dr. UFRRJ

---

Silvaldo Felipe da Silveira. Dr. UENF

## DEDICATÓRIA

*Ao meu filho, que*

*Sempre me compreendeu;*

*Aos meus pais, que*

*Sempre me apoiaram;*

*Ao meu marido, que*

*Sempre me incentivou;*

*À minha irmã, que*

*Sempre confiou em mim;*

*Ao meu orientador, que*

*Nunca duvidou de mim;*

*E a Deus, por sempre iluminar meu caminho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Bruno Costa Poltronieri, meu marido querido por ter sido mais que maravilhoso, por ser muito, muito companheiro e ficar sempre ao meu lado me ajudando sempre que eu precisava, em ir comigo durante diversas semanas seguidas todos os sábados e domingos na universidade e por todo carinho, amor e força que me deu nesta etapa;

Ao meu filho lindo por entender todos os meus momentos, me ajudar e ficar sempre com um grande sorriso quando ia nos finais de semana, passear na universidade, ver meus fungos e molhar as plantas;

Aos meus pais Carmen e Floriano por toda a ajuda, por eu sempre poder contar com eles, e pela luta em fazer com que parte deste sonho possa ter se realizado e por serem meus exemplos de vida e de força;

À minha irmã Tálitha, por todo carinho, atenção e incentivo durante todo período do mestrado;

Ao meu querido Professor e orientador Luís Antônio Siqueira de Azevedo pela confiança em mim depositada e oportunidade, por ser como um grande pai e por estar sempre disponível, pelas conversas descontraídas e alegres, pelo carinho e pelas críticas construtivas e importantes na realização desta pesquisa e decorrer de minha formação;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada (PPGFBA) e ao Departamento de Entomologia e Fitopatologia (DEnF), particularmente à Área da Fitopatologia, por tornar possível a realização dessa etapa profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda financeira para a execução dos experimentos e concessão da bolsa de estudos de mestrado do Programa Demanda Social;

Ao Dr. Cleber Bastos da CEPLAC que me disponibilizou o óleo de *Piper aduncum* e disponibilizou também seu tempo para dúvidas que poderiam surgir;

À pesquisadora Marli Poltronieri pela ajuda e apoio dado durante a pesquisa;

Ao Professor João Pedro Pimentel, pela amizade, por todos os conselhos durante esses dois anos de curso e pelas informações científicas extremamente práticas;

A Daniela Reis, que com a ajuda do Professor Luís Antônio, viabilizou a coleta de frutos de juçara com antracnose, para obtenção dos isolados de *Colletotrichum* utilizados nos trabalhos da dissertação;

Ao professor Mauricio Ballesteiro Pereira (Depto. Genética, UFRRJ) pelas sugestões nas análises estatísticas, pela colaboração nas análises e grande ajuda, por toda a disponibilidade e atenção que me ofereceu;

À Professora e coordenadora do PPGFBA, Dr<sup>a</sup>. Elen de Lima Aguiar Menezes (DEnF/UFRRJ), por sempre nos ajudar em todos os momentos, fazendo sempre o possível para conseguir todo o material necessário para as pesquisas;

Às amigas Elaine Azevedo e Ivanete Ferreira, funcionárias terceirizadas da Área da Fitopatologia do DEnF, pela amizade e carinho, por todas as festas surpresas e almoços, que estarão para sempre guardados na memória, pelos momentos de descontração e companheirismo, tentando sempre ajudar da melhor forma possível;

Ao Roberto Tadeu de Souza de Oliveira, secretário do PPGFBA, pela amizade, pelas conversas engraçadíssimas, por estar sempre fazendo de tudo para conseguir tudo o que lhe pedimos, pelo Jornalzinho da Fitopatologia que nos tirava altas gargalhadas, enfim por tudo;

À amiga do PPGFBA Diene Elen Miranda da Silva, pelos momentos de companheirismo, pela amizade e pela grande ajuda que me deu nos experimentos, de ficar até altas horas no laboratório só para me fazer companhia e para sairmos de lá morrendo de medo do escuro, pela cumplicidade, em fim por tudo;

Aos amigos do PPGFBA Vinicius de Abreu D'Ávila e Francisco Lúcio da Silva Beltrão por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, em que estudávamos, virávamos a noite conversando e rindo, ou mesmo os que passávamos jogando videogame, em que o Francisco acabou fazendo todos quase que se viciarem;

Às amigas do PPGFBA Natália Arruda Sanglard e Rafaela Andrade Dias por todos os momentos de descontração, por toda a amizade que me proporcionaram durante esse um ano que nos conhecemos;

Aos professores Dr. Fernando José Freire (Depto. Solos, UFRPE) e Dr. Luís Gustavo Chaves da Silva (Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Agroindústria Tropical) pela ajuda nas análises de PCR;

A grande amiga do PPGFBA Mônica Lau da Silva Marques, por todos os momentos que passamos no laboratório da Área da Fitopatologia do DEnF, pela amizade, pelas palavras de apoio, por me escutar, por se mostrar uma grande amiga desde primeiro dia em que me viu.

Ao amigo e técnico de laboratório da Área da Fitopatologia do DEnF, Hemyson Porto de Souza, por tantos momentos de conversas e descontração, pelas nossas eternas discordâncias que claro acabavam em grandes gargalhadas, afinal ele nunca aceitava que eu estava certa!

À professora Dr<sup>a</sup>. Helena Guglielmi Montano (DEnF/UFRRJ), pela acolhida, apoio e por ter me disponibilizado os materiais necessários para este estudo.

Ao professor Dr. Carlos Antônio Inácio (DEnF/UFRRJ) pela atenção e ajuda no preparo do abstract da minha dissertação.

## RESUMO GERAL

POLTRONIERI, Tathianne Pastana de Sousa. **Patogenicidade, efeito da temperatura no desenvolvimento e controle de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da antracnose da juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. 2012. 85p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A palmeira juçara (*Euterpe edulis*), nativa do bioma Mata Atlântica, tem um enorme potencial em termos ecológicos e econômicos. Utilizada apenas para a produção de palmito, mas a sua exploração desordenada acabou levando a esta espécie de palmeira ao risco de extinção. Devido a isso diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de se descobrir métodos de extrativismo sem a destruição da planta. Recentemente uma maior atenção tem sido dada aos seus frutos para a produção de polpa similar ao açaí produzido na Amazônia, porém com índices nutricionais bem mais elevados. Existem poucos estudos sobre as doenças que atacam a palmeira juçara. A principal doença já relatada é a antracnose, causando desfolhamento, morte dos ponteiros e podridão dos frutos. Como as características fisiológicas de isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em juçara não são conhecidas, este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de diferentes isolados obtidos em quatro locais dos municípios de Paraty (RJ) e Ubatuba (SP), avaliar o efeito da temperatura no desenvolvimento fúngico, a fim de se conhecer a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno nesses locais e avaliar a viabilidade de se utilizar óleos essenciais no controle *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, RJ). O crescimento dos quatro isolados foi avaliado *in vitro* nas temperaturas de 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 32°C e 35°C, usando câmara climatizada BOD, com cinco repetições. A temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo foi 28°C, para todos os isolados avaliados. Com base nesta temperatura foi realizado testes *in vitro* com óleos essenciais de três espécies botânicas: pimenta de macaco (*Piper aduncum*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e nim (*Azadirachta indica*), em diferentes concentrações: 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500µg/ml, para avaliar a fungitoxidade desses óleos essenciais no crescimento de *C. gloeosporioides* durante sete dias. Foi observado que o óleo de cravo-da-índia apresentou maior efeito fungitóxico quando comparado aos demais, inibindo o crescimento micelial na menor concentração (100µg/ml), seguido do óleo de *Piper aduncum*. O óleo de nim apresentou inibição parcial do crescimento micelial em todas as concentrações avaliadas.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, controle alternativo, temperatura, óleos essenciais.



## ABSTRACT

POLTRONIERI, Tathianne Pastana de Sousa. **Pathogenicity, effect of temperature on the development and control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose of juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. 2012. 85p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The juçara palm tree (*Euterpe edulis*), native from the Atlantic Rainforest biome, has an enormous ecological and economic potential. It is used only to the production of palm, but its disordered exploration takes this palm species to risk of extinction. Due to this reason, several studies are being conducted in order to discover methods of extraction without destroying the plant. Recently more attention has been given to its fruits to pulp production similar to that açai produced in the Brazilian Amazon, however, with higher nutritional indexes. There are few studies of the diseases that attack the juçara palm tree. The main disease already reported is the anthracnose, which cause defoliation, dieback and fruit rotting. As the physiological characteristics of the isolates of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* in juçara are unknown, this study aimed to evaluate the pathogenicity of different isolates obtained from four locals of the municipalities of Paraty (RJ) and Ubatuba (SP), to evaluate the effect of temperature on the fungal development, in order to know the ideal temperature for the development of the pathogen on these locals, and evaluate the viability to use the essential oils in the control *in vitro* of *C. gloeosporioides*. The experiments were carried out in the laboratory of Plant Pathology at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, RJ, Brazil). The growth of four isolates *in vitro* were evaluated under six temperatures at 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 32°C, and 35°C, using BOD chamber, with five replications. The optimal temperature for fungal growth was 28°C for all isolates evaluated. Based on this temperature, tests *in vitro* was performed with essential oils of the botanical species: spiked pepper (*Piper aduncum*), clove (*Caryophyllus aromaticus*), and neem (*Azadirachta indica*) at different concentrations: 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 1500 µg/ml in order to evaluate the fungitoxic effect of these oils on the growth of *C. gloeosporioides* for seven days. It was observed that the oil of clove has higher fungitoxic effect than the other oils evaluated, inhibiting the mycelial growth at the lowest concentration (100 µg/ml), and followed by the oil of *Piper aduncum*. The neem oil showed partial inhibition of mycelial growth at all the concentrations evaluated.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, alternative control, temperature, essential oils.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1** – Média de inibição do crescimento micelial *in vitro* do isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de diferentes concentrações de óleo de *Piper aduncum*, cravo-da-índia e óleo de nim. ....47

**Tabela 2**- Médias da produção de conídios dos isolado Camburi, Corcovado, Praia Almada e Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos a diferentes concentrações dos óleos *Piper aduncum*, cravo-da-índia e nim. .... 60

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

#### Introdução e Referencial Teórico

- Figura 1 – Ocorrência natural de *Euterpe edulis* e o domínio da Mata Atlântica ..... 4
- Figura 2 – Ocorrência atual da palmeira juçara..... 5
- Figura 3 – Cachos Sadios de *Euterpe edulis* ..... 6
- Figura 4 – Fluxograma de coleta de amostras de açaí de *Euterpe edulis* em linha de produção industrial..... 8
- Figura 5 - Sintomas de Antracnose nos frutos das quatro diferentes áreas de coleta A- Camburi, B- Corcovado, C- Praia Almada, D- Praia Brava..... 10

### Capítulo II

#### Patogenicidade e efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.)

- Figura 6 – Sintomas de antracnose em frutos de palmeira juçara inoculados com o complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. ..... 25
- Figura 7 - Gel de eletroforese, com marcadores ITS4 específico para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* respectivamente CGINT e CAINI, bem como os marcadores para a  $\beta$ -tubulina, específicas também para as duas espécies seguindo a mesma ordem CGTUB E CATUB, respectivamente para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*..... 26
- Figura 8 – Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas..... 27
- Figura 9 – Médias de crescimento radial de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas..... 28
- Figura 10 – Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos às diferentes temperaturas A – Temperatura de 20°C, B – Temperatura de 25°C, C – Temperatura de 28°C, D – Temperatura de 30°C, E – Temperatura de 32°C, F – Temperatura de 35°C. .... 29
- Figura 11 - Produção de conídios de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas..... 29
- Figura 12 - Germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* de quatro isolados de palmito juçara em diferentes temperaturas ..... 30

### Capítulo III

#### Avaliação de óleos vegetais na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*

- Figura 13 – Diâmetro da colônia dos isolado A – Camburi, B – Corcovado, C- Praia Almada e D- Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* em doses crescentes de oleos essências de *Piper adundum*, cravo-da-índia e nim. .... 46
- Figura 14 – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 48
- Figura 15- Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 48
- Figura 16 - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml. .... 48
- Figura 17 - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 49
- Figura 18- Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 50
- Figura 19- Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 50
- Figura 20 – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml. .... 51
- Figura 21 – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml..... 51
- Figura 22 - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G - 1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml. .... 52

Figura 23 - Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.....	52
Figura 24 - Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.....	53
Figura 25 – Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F- 1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.....	53
Figura 26 - Diâmetro da colônia dos isolado A – Camburi, B – Corcovado, C- Praia Almada e D- Praia Brava de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em doses crescentes de oleos essências de <i>Piper aduncum</i> , <i>cravo-da-índia</i> e nim, submetidos a diluição em álcool etílico a 98% .....	54
Figura 27- Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> com diluição sob diferentes concentrações. A –Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml.....	55
Figura 28 - Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> com diluição sob diferentes concentrações. A –Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml.....	56
Figura 29 - Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> com diluição sob diferentes concentrações. A –Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml.....	57
Figura 30 - Culturas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> com diluição sob diferentes concentrações. A –Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml.....	58
Figura 31- Curva de regressão de produção de conídios dos isolados A e B-Camburi, C e D- Corcovado, E e F-Praia Almada e G e H- Praia Brava de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> submetidos à ação dos óleos de <i>Piper aduncum</i> , <i>cravo-da-índia</i> e nim nos ensaios sem diluição (coluna da esquerda) e com diluição (coluna da direita). .....	59

## **LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS**

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ERJOH – Estação experimental de Recursos Genéticos do Cacau  
IUPAC – União Internacional de Química Pura Aplicada  
IVCM – Índice de Velocidade do Crescimento Micelial  
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (Colesterol Ruim)  
PCR – Reação em cadeia de Polimerase  
BDA – Batata Dextrose e Ágar  
PDA-Mata Atlântica – Subprogramas Projetos Administrativos  
PESM – Parque Estadual do Serra Mar  
TEAC – Atividade Antioxidante  
UC – Unidade de Conservação  
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I</b> .....	1
<b>Introdução e Referencial Teórico</b> .....	1
<b>1 - Introdução</b> .....	2
<b>2 – Revisão de Literatura</b> .....	4
2.1 A Mata Atlântica e a Palmeira Juçara .....	4
2.2 A Palmeira Juçara ( <i>Euterpe edulis</i> Martius.) .....	6
2.3 Os frutos da Palmeira Juçara.....	7
2.5 A Germinação .....	9
2.6 A Antracnose.....	9
2.7 A Espécie <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	10
<b>3 – Referências Bibliográficas</b> .....	12
<b>Capítulo II</b> .....	17
<b>Patogenicidade e efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, obtidos de frutos de palmeira juçara (<i>Euterpe edulis</i> Mart.)</b> .....	17
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	19
<b>1 – Introdução</b> .....	20
<b>2 - Revisão Bibliográfica</b> .....	21
<b>3 - Materiais e Métodos</b> .....	22
3.1 Coletas de Material, Isolamento de Patógeno e Identificação do Fungo .....	22
3.2 Teste de Patogenicidade .....	22
3.3 Caracterização Molecular e Reação de PCR.....	23
3.4. Caracterização dos Isolados .....	23
<b>4 - Resultados e Discussão</b> .....	25
4.1 Testes de Patogenicidade .....	25
4.2 Caracterização Molecular.....	25
4.3 Resultados da Temperatura .....	26
<b>5 – Conclusão</b> .....	31
<b>6 – Referências Bibliográficas</b> .....	32
<b>Capítulo III</b> .....	35
<b>Avaliação de óleos vegetais na inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b> .....	35
<b>RESUMO</b> .....	36
<b>ABSTRACT</b> .....	37
<b>1 – Introdução</b> .....	38
<b>2 – Revisão Bibliográfica</b> .....	39
2.1 A Antracnose.....	39
2.2 Controle Alternativo.....	39
2.3 Óleos Vegetais Utilizados .....	41
<b>3 – Materiais e Métodos</b> .....	44
3.1 Delineamentos Experimentais.....	44
3.2 Avaliação.....	45
<b>4 - Resultados e Discussão</b> .....	46
<b>5 – Conclusão</b> .....	62

<b>6 – Conclusões Gerais .....</b>	<b>63</b>
<b>7 – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>64</b>



---

**Introdução e Referencial Teórico**

## 1 - Introdução

A palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.), nativa da Mata Atlântica, também conhecida como palmitreiro, apresenta grande potencial em termos ecológicos e econômicos. Tradicionalmente essa palmeira era utilizada apenas para a produção de palmito. Apesar da exploração extrativista desordenada e sem controle, ter acarretado o risco de extinção da espécie, ainda representa uma opção de renda para muitas famílias de agricultores de comunidades tradicionais, como caiçaras, quilombolas e principalmente indígenas. Recentemente, uma maior atenção tem sido dada ao potencial de seus frutos para a produção de polpa, bastante similar à dos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea*), produzido na Amazônia. Ainda que exista literatura sobre a palmeira juçara, contemplando a ecologia da espécie e seu manejo para produção de palmito, são escassas as pesquisas direcionadas ao manejo dos frutos. O código florestal dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro não prevê regulamentação para essa atividade.

A implementação de um programa de manejo adequado do palmitreiro, pode trazer benefícios ambientais múltiplos, como a recuperação e conservação das florestas em corredores, fragmentos, nascentes de rios e maior abundância de alimento para a fauna polinizadora e dispersora, entre outros aspectos (Costa et al., 2006). Em médio e longo prazo o desenvolvimento de agroflorestas, tendo a palmeira juçara como espécie-chave, pode alavancar a produção de frutos, integrando sistemas de cultivo mais diversificados, potencializando assim, acesso a mercados e geração de renda (APTA, 2008).

Diante da necessidade de disciplinar o uso da polpa de juçara, em 2008, foi publicado no Diário Oficial do Estado de São Paulo, a Resolução SMA – 23, que institui grupo de trabalho para propor modificações na Resolução SMA – 16 de 1994, que trata apenas do manejo sustentável do palmito juçara. Até o presente momento nenhuma normatização foi publicada decorrente do grupo de trabalho instituído (SÃO PAULO, 1994; SÃO PAULO, 2008).

No ano de 2006, o Ministério do Meio Ambiente lançou o programa PDA- Mata Atlântica disponibilizando recursos financeiros. O IPEMA (Instituto de Permacultura e Ecovilas da Mata Atlântica), localizado no município de Ubatuba, foi contemplado em seu projeto, intitulado Educação Agroflorestal para o Manejo Sustentável nas Comunidades Tradicionais da Mata Atlântica, com foco no manejo sustentável dos frutos da palmeira juçara. Neste mesmo ano, o Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar, definiu como ação estratégica para os programas de proteção, patrimônio natural e interação socioambiental, a recuperação das populações de juçara e o desenvolvimento de alternativas para o seu manejo sustentável na área de influência do Parque (REIS; AZEVEDO, 2010).

Os estudos sobre as doenças, especificamente aquelas que infectam os frutos dessa palmeira são ainda raros. Como qualquer outra espécie, as palmeiras estão sujeitas à incidência de pragas e doenças que podem alterar a quantidade e a qualidade do palmito, da polpa a ser produzida e da germinação das sementes. Uma das doenças que incidem na espécie *E. edulis* é a antracnose. A doença é mais frequente e severa em uma determinada área a partir do segundo ano de cultivo (SEMA, 2008; AZEVEDO; ABREU; REIS, 2008).

A identificação da antracnose como principal doença da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) na região da Mata Atlântica, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., demonstra a grande necessidade de busca de alternativas que visem à comprovação do seu potencial fúngico e seu controle. Dessa forma, torna-se necessário estudar melhor o patógeno, a interação patógeno-hospedeiro e as condições que predisõem a planta ao patógeno. As variáveis climáticas, entre elas a temperatura, exercem importância vital tanto na infecção quanto na colonização do

patógeno, constituindo-se na variável climática mais correlacionada com as respostas biológicas (DIAS et al., 2005).

Apesar das várias estratégias para o controle de doenças, dependendo do agente causal, o controle químico é o mais utilizado. Nos sistemas agroecológicos, contudo, é desejável estabelecer um sistema de manejo que possa ser equilibrado quanto ao controle de fitopatógenos e menos agressivo ao meio ambiente. A identificação e uso de compostos vegetais que tenham propriedades fungitóxicas tornam-se uma alternativa que pode contribuir para minimizar os danos provocados por doenças e preservar o meio ambiente (MELO et al., 2009).

A utilização de produtos naturais no controle de doenças de plantas tem se tornado um meio eficiente em alguns sistemas agrícolas. A exploração da atividade biológica dos metabólitos secundários dos extratos brutos e dos óleos essenciais de plantas surge como uma forma potencial de controle alternativo de doenças das plantas cultivadas (PENTEADO, 2007).

A pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta aromática da família Piperaceae, nativa da região Amazônica, com alto teor de óleo essencial (2,5 a 4%), rico em dilapiol. Este composto químico é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida com a vantagem de ser um produto biodegradável (SILVA; BARRETO; SERÔNIO, 2004). Diversos estudos fitopatológicos demonstram que o óleo essencial possui atividade fungicida, controlando efetivamente os fungos *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causal da vassoura de bruxa em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex Spreng.)], assim como em *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx, causador da antracnose em frutos de bananeira (*Musa* spp.) (BASTOS; ALBUQUERQUE 2004).

Um dos mais importantes compostos capazes de inibir a síntese de aflatoxina é o extrato de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). O nim é uma árvore nativa de regiões subtropicais da Ásia e África. Substâncias obtidas de diversas partes dessa árvore (caule, folhas e sementes) têm demonstrado uma eficácia incomum contra um amplo espectro de insetos, fungos e vírus. Vários componentes, principalmente os tetranortriterpenoides, têm sido identificados como os ingredientes ativos responsáveis por essa atividade. Devido à sua eficácia, da biodegradabilidade e dos efeitos indesejáveis mínimos, a azadiractina, um tetranortriterpenoide obtido a partir de sementes de nim, tem sido apontada como biopraguicida (COSTA, 2009).

Estudos fitoquímicos do cravo revelam a presença de até 90% de óleo essencial, no qual o eugenol é o componente majoritário, acompanhado por transcariofileno, acetato de eugenila e a-humuleno (PAOLI et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). O óleo essencial é obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes. Segundo Amaral; Bara (2005), Park et al. (2007) e Nzeako; Lawati (2008), o eugenol pode contribuir com atividade antifúngica e antibacteriana (LORENZI; MATOS, 2002; PAHLOW, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008) *apud* COSTA et al. 2011).

Com base nessas premissas, o objetivo deste trabalho, foi o de identificar a melhor temperatura para crescimento *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Capítulo 2). Avaliou-se também o efeito fungitóxico de diferentes concentrações de óleos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, com o objetivo de se desenvolver um método alternativo de controle para antracnose da palmeira juçara, em regiões litorâneas (Capítulo 3). Visando uma estratégia de conservação desta espécie através da utilização do fruto.

## 2 – Revisão de Literatura

### 2.1 A Mata Atlântica e a Palmeira Juçara

O domínio da Mata Atlântica engloba uma área de aproximadamente 1.306 mil quilômetros quadrados, equivalente a cerca de 15% do território brasileiro (Dossiê Mata Atlântica, 2001). Sua região de ocorrência original abrangia 17 Estados da Federação: Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe e São Paulo. A *Euterpe edulis* ocorre naturalmente no domínio da Mata Atlântica brasileira, a partir do sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, sendo menos frequente em altitudes acima de 700m, podendo ocorrer fora dela em algumas regiões do Rio Grande do Sul (Figura 1) (FERNANDES; SILVA, 2009).



**Figura 1** – Ocorrência natural de *Euterpe edulis* e o domínio da Mata Atlântica.  
Fonte: SIMÕES; LINO (orgs.), 2002.

Ao longo dos anos o palmito representou um dos mais importantes produtos não madeireiros explorados na Mata Atlântica. Os fatores que mais influenciaram a extração intensiva dos palmiteiros estão relacionados à abundância e à facilidade de processamento e exploração do seu fruto (FERNANDES; SILVA, 2009).

Os palmiteiros encontram-se ameaçados de extinção em quase todos os estados, sendo limitadas principalmente as Unidades de Conservação. A extração desenfreada e os outros fatores reduziram a densidade populacional e a capacidade de regeneração natural da espécie. Os estados que ainda possuem palmiteiros com alta densidade populacional são os únicos que possuem normas para sua exploração. São eles: Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul, estes possuem fragmentos com densidade acima de 400 indivíduos por hectare (Figura 2).



**Figura 2** – Ocorrência atual da palmeira juçara.  
Fonte: SIMÕES; LINO (orgs.), 2002.

A destruição acelerada da Floresta Atlântica e a demanda do palmito estão entre os fatores que quase levaram à extinção da juçara. Outro fator que contribuiu para isso foi o crescimento das famílias das classes social média e alta, que consomem 70% do palmito produzido no Brasil (SCHOENINGER, 2003).

O Estado de São Paulo detém a maior área de Mata Atlântica e ecossistemas associados do país, cerca de 17 mil km<sup>2</sup>, representando aproximadamente 7% de sua cobertura vegetal original. As dificuldades de exploração das regiões litorâneas, impostas pelo relevo acidentado na encosta da Serra do Mar, fizeram com que algumas áreas sofressem menor impacto antrópico, estando hoje em melhor estado de preservação. Essas regiões que mantiveram suas características ambientais pouco alteradas ficaram sujeitas à criação de Unidades de Conservação (UC), como forma de garantir sua integridade, baseando-se na preservação dos recursos naturais (DIEGUES, 2004). Em uma dessas regiões, encontra-se o município de Ubatuba localizado no extremo leste do litoral norte do Estado de São Paulo, entre a latitude 23°26'13 S e longitude 45°04'08 O (APTA, 2008). Este município foi contemplado pelo Plano de Manejo do Parque estadual da Serra Mar, aprovado em 2006, que definiu como ação estratégica para os programas de proteção, patrimônio natural e interação socioambiental, a recuperação das populações de palmito e o desenvolvimento de alternativas para seu manejo sustentável na área de influência do parque.



## 2.2 A Palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius.)

A espécie *Euterpe edulis* Mart. pertence à família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Areceae e subtribo Euterpeinae (APG II, 2003). Popularmente apresenta varias denominações como palmito, palmiteiro, palmito doce, palmeira juçara, iaçara, ripa, sarova e ensarova (MARTINS; LIMA, 1999).

Os “cachos” possuem em média 3,0 kg (REIS, 1995) com milhares de frutos que pesam em média uma grama e medem de 10 a 15 milímetros de diâmetro (HENDERSON, 2000), como pode observar na Figura 3. Estes são drupáceos, esféricos, de cor quase preta ou negro-vinosa quando maduros com mesocarpo carnoso muito fino, geralmente unisseminados, com endocarpo lenhoso envolvendo completamente a semente (REITZ; KLEIN; REIS, 1988). A estrutura lenhosa do endocarpo juntamente com a semente é o pirênio (“caroço” ou “coquinho”), que popularmente é chamado de semente.



**Figura 3** – Cachos Sadios de *Euterpe edulis*

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

A semente possui embrião lateral e endosperma abundante e homogêneo (REITZ; KLEIN; REIS, 1988). As sementes são recalcitrantes, não toleram desidratação excessiva (QUEIROZ, 2000) e em condições naturais germinam formando bancos de plântulas sob a floresta. Populações naturais de juçara apresentam estrutura demográfica em forma de pirâmide, com uma maior proporção de indivíduos jovens (cerca de 70%) e poucos indivíduos adultos (0.3%) (REIS, 1995).

Possui extrema importância ecológica na cadeia alimentar do ecossistema florestal, pois apresenta altos níveis de interação com os animais e desempenha significativo papel na nutrição de fauna na mata atlântica, uma vez que seu fruto serve de alimento para aves e mamíferos, como roedores, marsupiais, primatas e morcegos (REIS; KAGEYAMA, 2000). A abundante produção de frutos e a grande gama de animais que dele se alimentam tornam esta palmeira, uma espécie muito importante na dinâmica florestal, pois atrai a fauna que dispersa

sementes de outras espécies vegetais, além de atrair predadores desses animais fugitivos (REIS, 1995). A formação de plântulas sob dossel florestal, também pode ser importante para herbívoros (FARVETO, 2010).

Paralelamente, possui grande importância ecológica na alimentação de insetos, devido à grande quantidade de flores, com grande quantidade de elementos florais, néctar e pólen (MANTOVANI; MORELLATO, 2000). Existe um grande número e variedade de insetos visitantes florais, das ordens Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Lepidoptera (MANTOVANI; MORELLATO, 2000), que também podem realizar a polinização de outras espécies florestais.

Entre os animais, jacutingas, tucanos, jacus, porcos-do-mato e antas estão entre as 70 espécies da fauna local que têm a palmeira juçara como fonte de alimento. São essas espécies que fazem a dispersão de suas sementes, as quais levam de um ano a um ano e meio para germinar. O palmito requer condições especiais para germinação, tem baixa capacidade de resiliência, não rebrota e tem crescimento muito lento. Por outro lado, tem potencial para o desenvolvimento sustentável e é um recurso muito cobiçado. Nos anos iniciais, a plântula necessita de meia-sombra, umidade e calor para sobreviver. Após os três anos iniciais, a planta precisa de maior quantidade de luz (CRUZ, 2011).

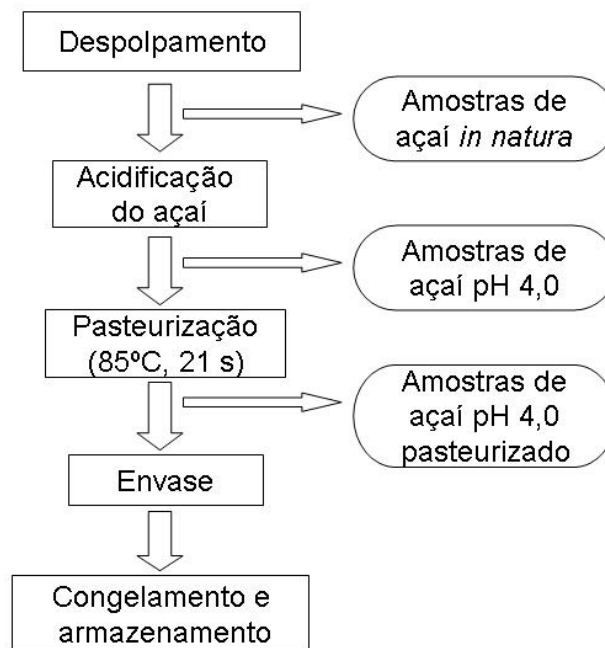
Há alguns anos, esta planta começou a receber uma maior atenção quanto ao potencial de seus frutos para a produção de polpa, similar à do açaí (*E. oleracea*), produzido na Amazônia. Na prática, a produção de polpa artesanal de *E. edulis* tem apresentado um rendimento em volume e concentração de polpa semelhante à de açaí. O manejo dos frutos da juçara para obtenção da polpa alimentar e de sementes pode ser considerado como uma importante estratégia de conservação desta espécie e das florestas nativas, além do potencial socioeconômico da segurança alimentar e geração de renda das comunidades caiçaras na Mata Atlântica (DA COSTA et al., 2006).

### **2.3 Os frutos da Palmeira Juçara**

A exploração sustentável dos frutos da palmeira juçara pode ser uma atividade mais lucrativa do que a extração do seu palmito. O tolete de palmito (cerca de 70 cm) pode ser vendido por R\$ 4,00. Já com a coleta dos frutos, o agricultor pode receber mais de R\$ 26,00, com a venda da polpa e das sementes resultantes do processo de despolpa (Figura 4) (CARDOSO; LEITE 2009).

As sementes obtidas após o despulpamento são usadas na produção de mudas, em repovoamento por semeadura a lanço e na confecção de artesanato, podendo também servir como adubo orgânico. O uso mais diferenciado observado foi o uso medicinal da seiva do palmito jovem, onde a seiva é utilizada para desinfecção, anestésico, ou para a coagulação do sangue em regiões do corpo de cães ou seres humanos, que foram afetados por cortes ou picados por cobra na mata (BARROSO; REIS; HANAZAKI, 2010).

A utilização dos frutos de juçara, ao contrário do que ocorre com o palmito não necessita da derrubada da árvore, que leva de cinco a oito anos para chegar ao estágio de corte. A coleta dos frutos pode ser realizada ano após ano na mesma palmeira e representa uma alternativa para a conservação da espécie e para o equilíbrio da cadeia alimentar da Mata Atlântica, visto que vários animais se nutrem deles (CARDOSO; LEITE, 2009).



**Figura 4** – Fluxograma de coleta de amostras de açaí de *Euterpe edulis* em linha de produção industrial. Fonte: SCHULTZ, 2008.

Segundo trabalho realizado no Centro de Pesquisa do Cacau - Cepec/Ceplac em 2004, no Sul da Bahia, a polpa de açaí da juçara apresentou composição nutricional compatível, e para alguns nutrientes até superior ao açaí do Norte do país. Com relação aos minerais, os teores de ferro, potássio e zinco da juçara foram 70,3%, 65,7% e 20,8%, respectivamente, superior ao encontrado no açaí do Norte. Já os valores de fósforo e cobre foram significativamente maiores no fruto do norte. Quanto aos teores de cálcio, magnésio e manganês, não foram encontradas diferenças significativas.

Importante mencionar que o aproveitamento do ferro de produtos vegetais, que inclui o açaí da juçara e o do norte, é menor comparado ao de produtos de origem animal. O aproveitamento deste mineral de fontes vegetais pode ser aumentado na presença de alimentos com fontes de vitamina C, como a laranja, limão, acerola, maracujá e cajá, dentre outros. A juçara também apresentou conteúdo de açúcares totais e gorduras maiores do que o açaí do norte e, conseqüentemente, maior valor energético. Porém, as gorduras presentes em ambos os produtos são as chamadas "gorduras boas", compostas por ácidos graxos insaturados, que muitas vezes, podem ser capazes de reduzir o colesterol no sangue. Nesta mesma pesquisa, durante um teste de degustação, foi observado que os participantes acharam mais doce o suco com o açaí da juçara e o preferiram em relação ao outro (SILVA; BARRETO; SERÔNIO, 2004).

A cor roxa escura dos frutos da *E. edulis* é devido à presença de antocianinas, que pertencem ao grupo de metabólitos secundários vegetais conhecidos como flavonoides. Possuem coloração que varia do vermelho intenso ao violeta e azul e são responsáveis pela variedade de cores em flores, folhas e frutos (SCHULTZ, 2008).

As antocianinas podem ser utilizadas como corantes naturais e apresentam grande potencial farmacológico, que incluem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do colesterol LDL, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares e de câncer (CARDOSO; LEITE, 2009).



Segundo SCHULTZ 2008, o açaí de *Euterpe edulis* apresentou maior teor de compostos fenólicos, antocianinas e maior atividade antioxidante (TEAC) do que o açaí de *Euterpe oleracea*. Em termos de mg.g<sup>-1</sup> de matéria seca, o açaí de *E. edulis* apresentou 81% mais compostos fenólicos e 353% mais antocianinas do que o açaí de *E. oleracea*. Portanto, a exploração dos frutos da palmeira juçara, utilizando um manejo sustentável adequado, pode ser mais lucrativa do que a comercialização do seu palmito. Além de contribuir para a preservação da espécie, o consumo da polpa dos frutos de juçara fornece grandes benefícios à saúde (CARDOSO; LEITE 2009).

## 2.4 A Germinação

Trabalhos anteriormente realizados por Reis, 2010 demonstraram que os frutos de palmeira juçara quando inoculados com micélios do fungo na fase de fruto e colocados para germinação demonstraram baixa capacidade de germinação quando comparados aos frutos sadios, contudo, as plantas que conseguiram se estabelecer mesmo sendo inoculadas não apresentaram sintomas de antracnose, seja nas folhas, caule ou qualquer outra área da planta. Rosseto (2006) cita em seu trabalho de antracnose em mangueira, que o patógeno pode ficar latente, vindo a se manifestar com sintomas visíveis apenas na maturação dos frutos.

## 2.5 A Antracnose

Segundo a cartilha do PESM (Parque estadual do Serra Mar) (2007), a *E. edulis* como qualquer outra espécie, as palmeiras estão sujeitas ao ataque de pragas e patógenos, que podem alterar a quantidade e qualidade do palmito e da polpa a ser produzida.

Uma das doenças que ocorre em *E. edulis* é a antracnose. Sua infecção ocasiona o desfolhamento, morte dos ponteiros e podridão de frutos. O surgimento da antracnose é favorecido pela elevada umidade, principalmente com chuvas frequentes e abundante temperatura média (26 a 28°C). Este fungo sobrevive em restos de cultura e tecidos afetados na própria planta, fazendo com que a doença seja mais frequente e severa em uma determinada área a partir do segundo ano de plantio (PESM, 2007).

A antracnose, doença cujo agente causal pertence ao complexo – *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. Pode ter como hospedeiros diversas espécies frutícolas e florestais, podendo afetar folhas e ramos em todas as fases de desenvolvimento da planta. A ocorrência da doença está associada à suscetibilidade da planta hospedeira e da variedade, e às condições de alta umidade do ar (GUIMARAES et al., 2011; MILANESI et al., 2009).

Sua incidência em juçara causa o desfolhamento, morte dos ponteiros e podridão dos frutos. As condições que favorecem a ocorrência de antracnose são umidade relativa elevada e altas temperaturas. O fungo sobrevive em restos de cultura e tecidos afetados na própria planta, por isso a doença é mais frequente e severa em uma determinada área a partir do segundo ano de cultivo. (SEMA, 2008; AZEVEDO; ABREU; REIS, 2008).

Os sintomas típicos desta doença são manchas necróticas, sendo que nos frutos verdes, as manchas apresentavam sintomas de pequenas pontuações de coloração marrom a negra, com formato circular e tamanho aproximado de, no máximo, 13 mm de diâmetro, enquanto os frutos maduros apresentaram sintomas de coloração acinzentada, devido à intensa esporulação do fungo (Figura 5). Com a evolução das lesões, que coalesceram, estas cobrem parcialmente ou totalmente os frutos, tornando-os necrosados. As necroses possuem coloração escura e

avançam da casca para o interior da polpa do fruto, ocasionando um apodrecimento generalizado (BATISTA et al., 2007).

Uma vez que os tecidos vegetais tenham sido colonizados pelas espécies de *Colletotrichum*, o patógeno altera seu comportamento para a necrotrofia, alimentando-se de nutrientes que exsudam da lesão. Sob condições ambientais e fisiológicas favoráveis à suscetibilidade, uma grande proporção de células colonizadas pode morrer antes de ser observado qualquer sintoma macroscópico da antracnose (LOPEZ, 2001).

O primeiro relato de antracnose em frutos de juçara (*Euterpe edulis*) foi encontrado em 2008 por Azevedo; Reis; Abreu na Mata Atlântica sendo identificado como agente causal *Colletotrichum gloeosporioides* já em *E. oleracea* (Açaí) foi registrado antracnose em 2005, no município de Muaná, no estado do Pará, região norte do país. Nesse estudo foi identificado o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* como sendo o agente causal da doença (BATISTA et al., 2007). Outros estudos já haviam identificado a mesma doença, em viveiro, em mudas de açaí e pupunhaa (SANTOS et al., 2007).



**Figura 5** - Sintomas de Antracnose nos frutos das quatro diferentes áreas de coleta A- Camburi, B- Corcovado, C- Praia Almada, D- Praia Brava.

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

## 2.6 A Espécie *Colletotrichum gloeosporioides*

O complexo *C. gloeosporioides* é reconhecido como um dos táxons mais importantes, sendo este registrados em 1967 publicações de ocorrência no mundo indicando a infecção em 904 hospedeiros (FARR E ROSSMAN, 2011 e PHOULIVONG et al., 2010).

A diferenciação de espécies *Colletotrichum* spp. com base no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não é um critério confiável para espécies que infectam diferentes hospedeiros (PERES et al., 2005). É frequente a ocorrência de mais de uma espécie ou *formae speciales* de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode atacar múltiplas hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998), por isso métodos moleculares tem sido ferramentas úteis na diferenciação das espécies pertencentes ao gênero (LOPEZ, 2001). A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a uma determinada hospedeira, bem como, a determinação de sua variabilidade, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença. No Brasil existem poucos estudos referentes a caracterização de *Colletotrichum*, em geral envolvem um número reduzido de isolados (Peres et al., 2002 apud GUIMARÃES et al., 2011)

O gênero *Colletotrichum* engloba os fungos anamórficos ou imperfeitos pertencentes à ordem Melanconiales da classe Coelomycetes, os quais apresentam associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* (SKIPP et al.,

1995; DUTRA, 2008). A distribuição geográfica das espécies de *Colletotrichum* é muito ampla, principalmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos (JEFFRIES et al., 1990; PEREIRA, 2009). A similaridade genética deste gênero com táxons compreende fungos endofíticos, saprofíticos até fitopatógenos, colocando-o entre os principais patógenos mundiais (KUMAR et al., 2004; PHOTITA et al., 2004; WACULICZ-ANDRADE, 2009). Segundo Wilson; Madden; Ellis, (1990), Bailey & Jeger (1992) e Ainsworth (1971) *apud* Pereira (2009), esses fitopatógenos são causadores de uma diversidade de doenças conhecidas como antracoses e afetam um grande número de culturas causando podridões de colmos, caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares e infecções latentes.

As características morfológicas que identificam o gênero *Colletotrichum* mostram seu conidióforo curto e agrupado, podendo ser separado por setas escuras e septadas juntamente a estrutura acervular. Conídios apresentavam formato cilíndrico, são unicelulares, de parede fina e delgada; e em seu interior apresentavam elementos denominados de gúttulas. Colônias de aspectos acinzentadas a salmão. Seu micélio é hialino, septado, pode formar juntamente ao tecido de seu hospedeiro estrutura denominada de acérvulo (SOUSA, 2010)

O desenvolvimento do complexo *C. gloeosporioides* é favorecido por temperatura e umidade relativa elevadas (BUFFON, 2010). Seus conídios são liberados e disseminados quando os acérvulos se encontram úmidos. Eles podem ser disseminados por respingos de chuva, vento, insetos, ferramentas, etc. Os conídios germinam na presença de água, produzem o apressório e iniciam a penetração no tecido do hospedeiro. As hifas crescem muito rapidamente, porém ocorrem poucos sintomas nos tecidos. A doença é mais severa quando os frutos começam a amadurecer (AGRIOS, 1998).

### 3 – Referências Bibliográficas

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Florida: Academic Pressol, v. 4, p. 817-820, 1998.

WACULICZ-ANDRADE, C. E. **Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea**. 79p. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2009.

APG II. Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, n. 4, p. 399-36, 2003.

APTA. Produção de polpa e sementes de Palmeira juçara: Alternativa de renda para a Mata Atlântica. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**. Dezembro de 2008 [www.apta.sp.gov.br](http://www.apta.sp.gov.br) Acesso em Maio de 2012.

AZEVEDO, L. A. S; ABREU, T. D; REIS, D. C. Antracnose of juçara palm tree (*Euterpe edulis* Mart.) in Brazil. In: SEMINÁRIO CIENTÍFICO INTERNACIONAL DE SANIDADE VEGETAL, 6.. Havana. **Resumos...** CENSA, 2008. p.39.

BARROSO, R. M.; REIS, A.; HANAZAKI, N. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 518-528, 2010.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BATISTA T. F. C. et al. Ocorrência de antracnose em frutos de açaí, *Euterpe oleracea*, em Muaná, Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 360- 2007.

BUFFON, R. B et al. Efeito de extratos de cravo da índia e pimenta malagueta no controle “in vitro” do *Colletotrichum gloeosporioides* In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 10., Vale do paraíba. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2010.

CARDOSO, L. M. C.; LEITE, J. P. V. Palmeira juçara: A exploração dos frutos é mais ecológica e rentável do que a do palmito. **Espaço do Produtor**, Universidade Federal de Viçosa, 2009. Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verArtigo.php?codigo=19&acao=exibir> Acesso: maio de 2012.

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

COSTA, C. L. de. **Efeitos do óleo de nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] sobre crescimento, esporulação, viabilidade de esporos, morfologia e produção de aflatoxinas B1 e B2 em *Aspergillus flavus***. 2009. 36f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá.

COSTA, R. A. Crescimento *in vitro* de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e refrigeração. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 387-390, 2006.

CRUZ, M. A. da. A matemática pode livrar o palmito juçara da extinção? Modelagem é ferramenta para o planejamento ambiental de unidades de conservação, **Jornal da Unicamp**, ANO XXV, N. 500, p. 9, Campinas, agosto de 2011 Disponível em: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/agosto2011/capa500.php](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2011/capa500.php) Acesso maio 2012

DA COSTA, E. A. D. et al. Produção de polpa e sementes dos frutos de *Euterpe edulis* – Uma alternativa de geração de renda e uso sustentável da mata Atlântica, **IPEMA**. Ubatuba, São Paulo, 2006.

DIAS, M.D. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, 2005.

DIEGUES, A. C. 2004. A mudança como modelo cultural: O caso da cultura caiçara e a urbanização. In: DIEGUES, A.C. (org). **O olhar do Pesquisador**. São Paulo: Ed.: HUCITEC-NUPAUB-CEC/USP. Cap. 1, p 21-48. In: **APTA**. Produção de polpa e sementes de Palmeira Juçara: Alternativa de renda para a Mata Atlântica. Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária. Dezembro de 2008 [www.apta.sp.gov.br](http://www.apta.sp.gov.br) acesso: abril 2012.

DOSSIÊ MATA ATLÂNTICA. Monitoramento participativo da Mata Atlântica. Capobianco J.P.R (org). São Paulo: ISA, 2001 (Rep) CD's HSM Ltda. In: FERNANDES, F. C. E; SILVA, J. de A. Palmito de juçara (*Euterpe edulis* Mart.): uma revisão segundo um modelo de cadeia produtiva, 2009, Monografia de Engenharia Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 2009.

DUTRA, J. B. **Controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) pós-colheita do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por aplicações de fosfito, água quente e 1-metilciclopropeno**. 2008. 151f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FARR, D. F.; ROSSMAN A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USTDA. 2011 Disponível em <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Acesso em julho de 2012.

FARVETO, R. **Aspectos etnoecológicos e ecofisiológicos de *Euterpe edulis* Mart.(Arecaceae)**. 2010. 143p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, 2010.

FERNANDES, F. C. E. A. **Palmito de juçara (*Euterpe edulis* Mart.): uma revisão segundo um modelo de cadeia produtiva**. 2009. 21p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

FREEMAN, S., KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605, 1998.

GUIMARÃES, G. R. et al. Aspectos morfológicos de isolados de *Colletotrichum* spp. Congresso brasileiro de fitopatologia 2011 - Disponível em: <http://www.slideshare.net/fitolima/aspectos-morfológicos-de-isolados-de-colletotrichum-spp> Acesso em julho de 2012.

HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: REIS, M. S.; REIS, A. (eds.). ***Euterpe edulis* Martius (palmito) – biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p. 1-22.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEEGER, M. J.; PUMBLEY, R. A. *Colletotrichum* species on tropical fruits. **Plant Pathology**, London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, v. 17, p. 69-90, 2004.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo, v. 9, p. 291-338, 2001.

MACEDO, J. H. P.; RITTESHOFER, F. O.; DESSEWFFY, A. A silvicultura e a indústria do palmito. Porto Alegre. **Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul**, 61p., s.d.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. In: REIS, M. S.; REIS, A. (eds.). ***Euterpe edulis* Martius (palmito) – biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Rodrigues, 2000. p. 28- 38.

MARTINS, S. V.; LIMA, D. G. 1999. **Culturas de palmeiras I: palmito (*Euterpe edulis* Mart)**. Viçosa: UFV. (Cadernos Didáticos, 54).

MELO, R. C. de A; MELO FILHO, P. de A, CAMARA, M. P. S; CAMARA, C. A. G. da; ALBUQUERQUE, M. B. de; SANTOS, R. C. dos. Inibição do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* com uso de óleo de Cravo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 7., Foz do Iguaçu. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 1088-1093.

MILANESI, P. M. et al. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.01-13. 2009.

PAOLI, S. et al. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood constituents with technetium and on the morphology of red blood cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 175-82, 2007.

PENTEADO, R. S. **Defensivos alternativos e naturais**. 3.ed. Campinas. SP, 2007, 172p.

PEREIRA, A.A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-93, 2008.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PERES, N.A. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, p. 784-796. 2005.

PESM. **Parque Estadual da Serra do Mar. Cartilha do projeto palmito juçara do parque estadual do serra mar, alternativa para o manejo sustentável da palmeira juçara.** Secretária do Meio Ambiente – Fundação Florestal, p. 22, Outubro 2007.

PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p. 131-140. 2004.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Indonesia, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

QUEIROZ, M. H. Biologia do fruto, da semente e da germinação do palmito (*Euterpe edulis* Martius). In: REIS, M. S.; REIS, A. (eds.). ***Euterpe edulis* Martius (Palmito): biologia, conservação e manejo.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p.39-59.

REIS, A. **Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius – (Palmae) em uma floresta densa Montana da Encosta Atlântica em Blumenau, SC.** 1995. 154f Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

REIS, A.; KAGEYAMA, P. Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius Palmae. In: REIS, M.S.; REIS, A. ***Euterpe edulis* Martius (palmito): biologia, conservação e manejo.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p. 60 – 92.

REIS, D. C. **Identificação da antracnose em palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.), no litoral norte do estado de São Paulo.** 35p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

REIS, D. C.; AZEVEDO, L. A. S. Manejo dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) para obtenção de polpa como uma alternativa de renda para comunidades caiçaras no município de Ubatuba, SP. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM MATA ATLÂNTICA, 1., Engenheiro Paulo de Frontin, RJ. **Resumos...** IZMA, 2010. p. 33.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, 1988. 25p.

ROSSETTO, C. J. **Doenças da Mangueira - Antracnose.** 2006. Disponível em: <<http://infobios.com/artigos/AntracnoseManga/Antracnose.htm>>. Acesso em: Junho de 2012.

SANTOS, A. F. et al. **Manejo fitossanitário em viveiros de palmeiras para palmitos.** Colombo/PR. Embrapa Florestas, 2007. 9 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 146).

SÃO PAULO. **Resolução SMA 23 de 10 de abril de 2008.** Institui grupo de trabalho para propor modificações na Resolução SMA 16, de 21 de junho de 1994. Disponível em:<<http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/estadual/resolucoes/ResolucaoSMA-23-2008.pdf>>. Acesso em: 02 de Maio de 2012.

SÃO PAULO. **Resolução SMA-16 de 21 de junho de 1994.** Estabelece normas para exploração da palmeira Jussara (*Euterpe edulis*) no Estado de São Paulo. Disponível

em:<[http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/estadual/resolucoes/1994\\_res\\_est\\_sma\\_16.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/estadual/resolucoes/1994_res_est_sma_16.pdf)>  
. Acesso: 02 de Maio de 2012.

SCHOENINGER, R.E. Quantificação e avaliação de parâmetros qualitativos do palmitero (*Euterpe edulis* Martius), ao longo de um gradiente altimétrico em um sistema de informação geográfica. **Revista Floresta**, v. 33, n. 2, p. 183-198, 2003.

SCHULTZ, J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação.** 2008. 52p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SEMA - Secretaria do Meio Ambiente, SP. Fundação Florestal. **Alternativas para o manejo sustentável da palmeira juçara.** São Paulo: Imprensa Oficial, 2008.

SILVA, M.G.C.P. C., BARRETO, W.S., SERÔNIO, M.H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, Centro de Pesquisa do Cacau – Cepec /Ceplac, 2004. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/index.asp>. Acesso em maio de 2012-05-25.

SIMÕES, L. L.; LINO, C. F (Orgs.). **Sustentável Mata Atlântica;** a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: Editora SENAC São Paulo, 2002. 215 p.

SKIPP, R. A. et al. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P. (Eds.) **Pathogenesis and host specificity in plant diseases.** Oxford, Pergamon/Elsevier. v. 2. p. 119-42, 1995.

SOUSA, P. V. de. Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Colletotrichum* sp.2010. Disponível em: [http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/06/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo\\_2213.html](http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/06/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_2213.html).

WILSON, L.L., MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, v. 80, p. 111- 116, 1990.



## Capítulo II

---

**Patogenicidade e efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**

## RESUMO

A palmeira juçara (*Euterpe edulis*) é uma das espécies mais importantes da Mata Atlântica. Hoje é encontrada na lista das espécies da flora ameaçadas de extinção, sendo inserida na categoria “Perigo de extinção”. O objetivo deste trabalho foi testar a patogenicidade de quatro isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de juçara da região de Paraty-RJ e Ubatuba-SP e avaliar a influência da temperatura no desenvolvimento desses isolados. Após a obtenção dos isolamentos monospóricos, foram realizados testes de patogenicidade em frutos de juçara e de açaí. Para isso, transferiu-se discos de micélio com sete mm de diâmetro das culturas monospóricas de cada isolado para vinte frutos de juçara e para quinze frutos de açaí. Os frutos foram colocados em câmara úmida por setenta e duas horas em temperatura ambiente para reprodução dos sintomas. A identificação da antracnose como principal doença desta palmeira, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, é a primeira etapa na busca de alternativas objetivando o manejo da mesma e seu controle. Três após a inoculação foram observados os sintomas da doença, após da confirmação do teste de patogenicidade tanto para juçara como para açaí, discos de micélio de sete mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e submetidos às temperaturas de 20, 25, 28, 32, 35°C. Foram avaliados as variáveis: crescimento micelial, produção e germinação de conídios. A maior taxa de crescimento micelial ocorreu à 28°C, seguida pela temperatura de 25°C. A temperatura de 28° demonstrou-se mais eficiente em relação à produção de conídios, seguida pela temperatura de 30°C. A germinação de conídios foi máxima em 28°C apresentando germinação na faixa de 84 a 87%. Conclui-se que a faixa ideal para crescimento de todas as variáveis avaliadas foi de 28°C.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Euterpe edulis*, juçara, temperatura, produção de conídios.

## ABSTRACT

The juçara palm tree (*Euterpe edulis*) is one of the most important species of the Atlantic forest. Nowadays the species is found in the list of plant species that is under “dangerous of extinction”. The objective of this study is to test pathogenicity of four isolates *C. gloeosporioides* that come from the juçara fruit in Paraty – RJ and Ubatuba-SP and evaluate the influence of temperature in the development of this isolates. After obtaining the spore isolates, pathogenicity tests were conducted on juçara fruit and açaí fruit. For this, mycelial discs with seven mm diameter monosporic cultures of each isolate were moved for twenty juçara fruits and fruit for fifteen açaí. The fruits were placed in a moist chamber for seventy-two hours at room temperature for reproduction of symptoms. The identification of anthracnose is the main disease of this palm caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is the first step in the search for alternatives aiming the same management and control. Three days after the inoculation were observed disease symptoms after the confirmation test for both pathogenicity to juçara as well as to açaí, mycelial discs of seven mm in diameter were transferred to the center of Petri dishes containing PDA medium and subjected to temperatures of 20, 25, 28, 32, 35 °C. Variables were assessed: mycelial growth, conidia production and germination. The highest rate of mycelial growth occurred at 28 ° C, followed by 25 ° C. A temperature of 28 ° demonstrated to be more efficient in the production of conidia, followed by 30 ° C. Conidia germination was maximal at 28 ° C germinate in the range 84-87%. Conclude that the ideal range for growth of all variables was 28 °C.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Euterpe edulis*, juçara, temperature, production of conidia.

## 1 – Introdução

A juçara, *Euterpe edulis* Mart., é uma palmeira típica da Floresta Atlântica, ocupando uma vasta extensão territorial, desde o sul da Bahia ao Rio Grande do Sul. Produz palmito de excelente qualidade, porém a exploração extrativista levou ao esgotamento da espécie nas reservas naturais (SILVA, BARRETO; SERÔNIO, 2004).

Os contínuos trabalhos buscando a retirada da palmeira juçara da lista das espécies ameaçadas de extinção mostram o grande potencial nutricional dos frutos desta palmeira. Contudo, recentemente foi descoberta a presença de antracnose em seus frutos, sendo capaz de reduzir drasticamente a produção a partir do segundo ano de plantio e inibir a germinação de seus frutos (REIS; AZEVEDO, 2010).

A identificação da antracnose como principal doença da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) na região da Mata Atlântica, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., demonstra a grande necessidade de busca de alternativas que visem à comprovação do seu potencial fúngico e seu controle. Dessa forma, torna-se necessário estudar melhor o patógeno, a interação patógeno-hospedeiro e as condições que predisõem a planta ao patógeno (DIAS et al., 2005).

O conhecimento dos efeitos do ambiente no desenvolvimento de patógenos muitas vezes pode auxiliar e definir estratégias de manejo de doenças. A temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores que afetam intensamente o progresso de doenças em plantas (SILVEIRA et al., 2001). A germinação e o crescimento dos fungos são muitas vezes afetados pela temperatura (OLIVEIRA et al., 2006), sendo capaz de funcionar como regulador da velocidade com que se desenvolvem as epidemias de doenças em plantas.

Diversas espécies de fungos são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais, porém, no caso das espécies de *Colletotrichum* esta identificação encontra dificuldades em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres em função do ambiente (ANDRADE et al., 2007).

Com o intuito de se determinar a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito desta variável no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *C. gloeosporioides* em diferentes temperaturas.

## 2 - Revisão Bibliográfica

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos, onde causam danos em diversas culturas, os quais são principalmente severos em frutos, a doença causada é conhecida como antracnose (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

Embora o gênero *Colletotrichum* seja citado como agente causal da antracnose em palmeira do gênero *Euterpe*, não há relatos na literatura de estudos mais detalhados de identificação e de caracterização da variabilidade fenotípica e genotípica de espécie(s) de *Colletotrichum* patogênica(s) em juçara. Considerando que a identificação do agente causal é o primeiro passo para estudos de medidas de controle de uma doença, tornam-se necessários estudos de identificação e caracterização da extensão da variabilidade de *Colletotrichum*. Apesar de existir extensa pesquisa sobre a antracnose em diversos hospedeiros (LOPEZ, 2001), praticamente nada se conhece sobre a epidemiologia do agente causal da antracnose em juçara. Esse conhecimento é indispensável para que o manejo da doença passe a basear-se em sólidas informações epidemiológicas (CAMPBELL & MADDEN, 1990; JONES, 1998).

A infecção nos frutos caracteriza-se pela presença de manchas de coloração marrom-escura que ao se coalescerem aumentam seu tamanho tomando uma grande área do fruto, diminuindo assim a produção de polpa e são capazes de inibir o desenvolvimento germinativo das sementes de juçara, impedindo assim o desenvolvimento de novas plantas.

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais afeta o desenvolvimento de fungos, sendo o efeito desse determinado de forma geral pelo diâmetro das lesões desenvolvidas sobre o hospedeiro (ADASKAVEG; FÖRSTER; SOMMER, 2002).

O crescimento dos fungos é resultado de vários processos controlados por enzimas. A atividade fúngica inicia-se a uma temperatura mínima, aumentando gradativamente até um valor ótimo declinando e parando quando submetida a uma temperatura máxima. Estas temperaturas variam para cada tipo de fungo e são chamadas temperaturas cardinais (OLIVEIRA; BASSANEZI; CAETANO, 2004). Estudos a respeito da influência da temperatura no crescimento de *Colletotrichum* podem ser encontrados em COUTO; MENEZES, 2004, VIEIRA et. al., 2006, ANDRADE et al., 2007, SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008 e MAIA et al., 2011.

A temperatura exerce grande influência no desenvolvimento em espécies do gênero *Colletotrichum*, tanto em seu crescimento micelial quanto na esporulação e germinação de conídios e até na coloração das colônias, podendo também deste modo, ser utilizada como parâmetro para diferenciação entre espécies (MAIA et al., 2011).

Informações sobre os fatores ambientais que favorecem os processos de pré-penetração e de infecção são valiosas no desenvolvimento de sistemas de previsão de doenças e podem contribuir por direcionar ações de controle (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008). Essas informações são desconhecidas no patossistema *Colletotrichum gloeosporioides*-juçara.

### 3 - Materiais e Métodos

#### 3.1 Coletas de Material, Isolamento de Patógeno e Identificação do Fungo

O estudo foi realizado a partir de materiais obtidos nos municípios de Paraty-RJ e Ubatuba-SP, litoral sul do estado do Rio de Janeiro e litoral norte do estado de São Paulo respectivamente, sob domínio de uma floresta ombrófila densa.

O clima da região segundo a classificação de Koeppen é considerado como tropical úmido com precipitação média anual em Ubatuba de 2154.2mm, e temperatura média no mês mais frio de 19°C (em julho) e no mês mais quente média de 26°C (em janeiro e fevereiro) (CEPAGRI, 2012), enquanto em Paraty encontrou-se precipitação média de 750 mm por ano, e temperatura média do mês mais frio de 12°C e no mês mais quente média de 38°C (CPTEC, 2012).

Durante o período de frutificação e floração de juçara, que se iniciam no final de fevereiro até início de julho e setembro até novembro, respectivamente, foram realizadas coleta de frutos em diferentes estádios de maturação, no ano de 2011 e 2012. As coletas foram realizadas em plantas ao acaso, apresentando frutos com sintomas típicos da doença, em quatro diferentes locais, sendo também coletados frutos sem sintomas. As amostras foram identificadas e transportadas para análise no Laboratório de Fitopatologia, do Instituto de Biologia, Departamento de Fitopatologia e Entomologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A coleta dos cachos foi realizada com o auxílio de peconha para escalada na planta, sendo coletado um cacho por planta, obtendo-se assim um total de seis cachos, sendo quatro provenientes de plantas visivelmente sintomáticas e dois provenientes de plantas aparentemente saudáveis. Para a coleta, foram consideradas saudáveis plantas que apresentavam o cacho bem formado e com boa produção de frutos, isento de quaisquer danos.

Para isolamento do patógeno, os frutos de juçara apresentando sintomas de antracnose, foram lavados com água corrente e sabão, posteriormente enxutos com papel toalha estéril. Foram então retirados fragmentos da área de transição da lesão, desinfestados com álcool a 70% por 30 segundos, em seguida transferidos para placas de Petri com hipoclorito de sódio a 1,5% por 2 minutos e lavados duas vezes em água destilada e esterilizada, para retirada do excesso de hipoclorito. Após esse procedimento, os fragmentos foram transferidos para as placas de Petri de plástico contendo meio de cultura BDA sintético (Batata Dextrose Ágar). As placas de Petri foram incubadas em câmaras de crescimento (BDO) a 25°C por 10 dias. Em seguida, após as colônias terem se desenvolvido foram repicadas para tubos de ensaio com BDA. Após incubação por sete dias em câmaras de crescimento a 25°C, foram feitas suspenções de conídios que foram riscadas em placas com meio BDA com o intuito de se obter culturas monospóricas, a fim de se garantir a pureza dos isolados.

Os isolados de *C. gloeosporioides* foram obtidos de materiais doentes, provenientes de frutos de juçara de quatro locais diferentes de coleta, entre as cidades de Paraty-RJ e Ubatuba-SP. As amostras foram coletadas nos seguintes locais: Camburi, Corcovado, Praia Almada e Praia Brava.

#### 3.2 Teste de Patogenicidade

Os testes de patogenicidade consistiram na inoculação dos isolados do fungo em frutos saudáveis de juçara. Após os isolamentos monospóricas das culturas, foram transferidos discos de

micélio com sete mm de diâmetro das culturas monospóricas para 20 frutos sadios de cada isolado de coleta e 20 frutos para testemunha, totalizando 100 frutos. Após a inoculação, os frutos foram colocados em câmara úmida de vidro, por 72 h em temperatura ambiente para a reprodução dos sintomas.

Foi avaliada também a patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de açaí (*Euterpe oleraceae*), obtidos através da compra no Mercado do Ver-o-Peso na cidade de Belém do Pará. Neste teste foram utilizados 15 frutos sadios para cada isolado e 15 frutos de testemunha, totalizando 75 frutos, que foram colocados em câmara úmida de vidro pelo período aproximado de 72 h em temperatura ambiente para a reprodução dos sintomas.

### 3.3 Caracterização Molecular e Reação de PCR

Após a constatação do gênero os Isolados foram enviados a Recife aos cuidados do Doutor Fernando José Freire e Luís Gustavo Chaves da Silva, onde foi extraído o DNA genômico do isolado de *Colletotrichum* de *E. edulis*, utilizando-se a metodologia descrita por Dellaporta; Wood; Hicks (1983). Para identificação molecular pela técnica de PCR, foram utilizados dois conjuntos de primers específicos para as espécies *C. gloeosporioides*, utilizando, CGINT (5' – GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG- 3') descrito por Mills; Sreenivasprasad & Brown (1992) em conjunto com o ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') descrito por White e Morrow (1990) que possibilitam amplificação de fragmentos de 450 pb. E para a identificação de *C. acutatum*, foi utilizado CAIN (5' – GGG GAA GC TCT CGC GG - 3') (SREENIVASAPRASAD *et al*, 1996) em conjunto com o ITS4 amplificando fragmento de 490 pb.

### 3.4 Caracterização dos Isolados

#### 3.4.1 Influência de temperatura no crescimento micelial dos isolados

O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, com quatro tratamentos (isolados), cada um com cinco repetições para cada uma das seis temperaturas. Foram realizados dois ensaios com o intuito de se obter uma maior consistência dos dados. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAEG. As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste de médias e à análise de regressão. O ajuste do modelo de regressão foi realizado utilizando-se as repetições das variáveis estudadas. Avaliou-se o ajuste dos modelos linear, quadrático, exponencial, logístico e polinomial. O modelo escolhido, utilizado para plotar o gráfico, foi aquele com maior R<sup>2</sup>, menor Quadrado Médio dos Desvios e melhor gráfico de distribuição de resíduos.

Discos de micélio dos quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* com sete mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio BDA. Incubou-se à 20°, 25°, 28°, 30°, 32° e 35°C, sob fotoperíodo de 12 h, durante sete dias em BOD.

A avaliação do crescimento micelial foi feita pela medição, a cada 24 h, do diâmetro das colônias, em posição ortogonal, durante sete dias, a partir do momento em que foram colocados os discos de micélio contendo o isolado. Os dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação

### **3.4.2 Avaliação da produção e germinação de conídios**

Para a determinação da produção de conídios, no sétimo dia, foi feita uma suspensão, com a mesma quantidade de água por placa (dois ml) e o auxílio de uma alça de Drigalski, a partir desta suspensão avaliou-se 10 lâminas por placa por isolado. Realizando a contagem do número de conídios com o auxílio da câmara de Newbauer.

Quanto à porcentagem de germinação conidial, uma alíquota de 20µL da suspensão dos conídios na concentração de  $2 \times 10^6$  foi colocada em microtubo de ensaio. Os microtubos foram mantidos em câmara de crescimento (BOD) a 20, 25, 28, 30, 32 e 35°C. Após 24 horas, procedeu-se à leitura, contando-se 100 conídios por lâmina por repetição de cada isolado, em cada temperatura. Foi considerado germinado o conídio cujo tubo germinativo apresentava 50% do tamanho do conídio.



## 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 Testes de Patogenicidade

De acordo com as características morfológicas e culturais apresentadas pelas colônias em batata dextrose e ágar (BDA), o fungo foi identificado como pertencente ao gênero *Colletotrichum* (BARNETT; HUNTER, 1998). Todos os isolados apresentaram na caracterização morfológica: micélio bastante ramificado, septado e hialino, apresentando acérvulos sem a presença de setas e conídios hialinos, com uma célula, predominantemente oblongos, com ápices arredondados, corroborando com a descrição feita por SUTTON (1992) Este patógeno causa a antracnose em juçara, o primeiro relato desta doença no Brasil foi feito por REIS; AZEVEDO (2010).

Os testes de patogenicidade para os quatro isolados analisados possibilitaram o aparecimento dos sintomas da antracnose da juçara, como seja: lesões nos frutos surgindo inicialmente com pontuações de coloração amarronzada progredindo para manchas necróticas de coloração preta, algumas vezes deprimidas que surgiram a partir de 3 três dias a contar da inoculação, reproduzindo os sintomas encontrados nos frutos colhidos como ilustra a Figura 6.

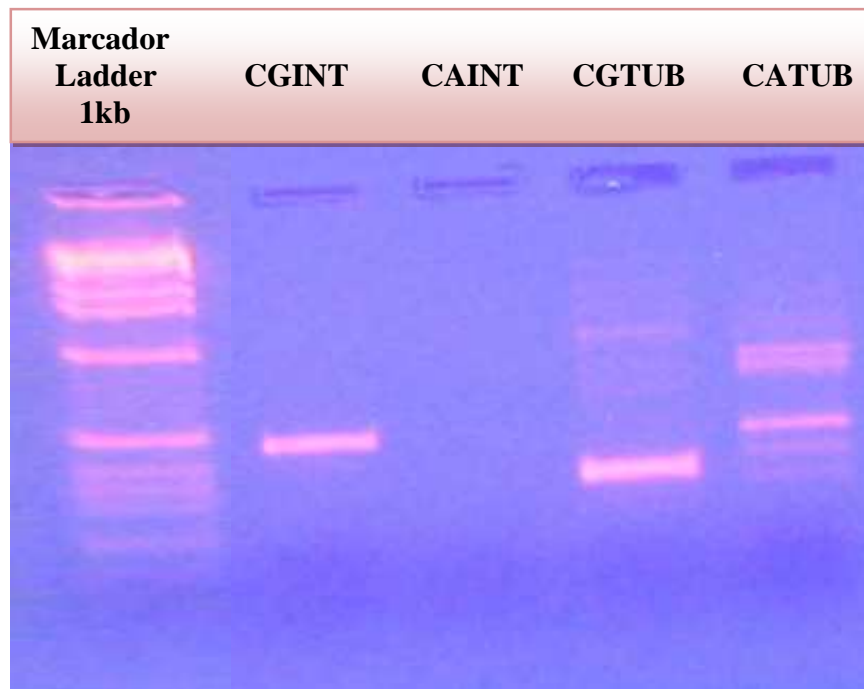


**Figura 6** – Sintomas de antracnose em frutos de palmeira juçara inoculados com o complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

### 4.2 Caracterização Molecular

Os resultados obtidos constataram que o agente etiológico da antracnose da juçara, faz parte do Complexo *C. gloeosporioides* conforme pode ser observado no gel de eletroforese (Figura 7). Pode-se observar a presença de bandas nos dois marcadores específicos a esta espécie (ITS4e  $\beta$ -tubulina). Não houve marcação para os *primers* para *C. acutatum*.

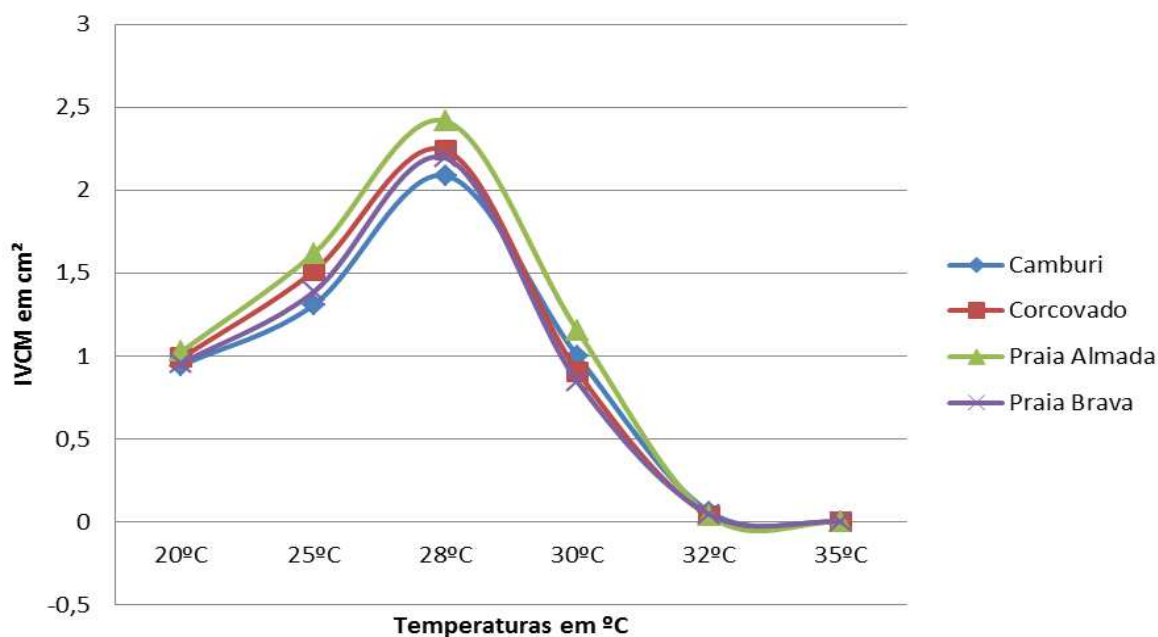


**Figura 7** - Gel de eletroforese, com marcadores ITS4 específico para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* respectivamente CGINT e CAINT, bem como os marcadores para a  $\beta$ -tubulina, específicas também para as duas espécies seguindo a mesma ordem CGTUB E CATUB, respectivamente para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

### 4.3 Resultados da Temperatura

Os dois ensaios realizados apresentaram resultados significativamente semelhantes em todas as avaliações realizadas

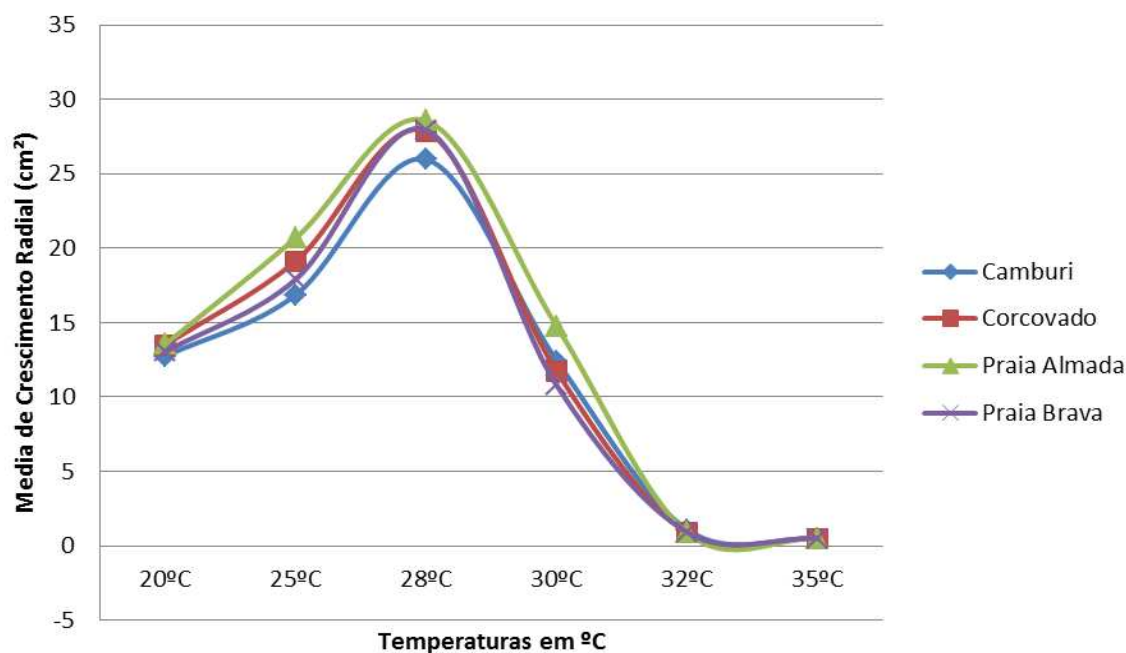
Foi observada interação significativa para o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) em todas as variáveis avaliadas. A interação isolado e temperatura não foi significativa, demonstrando não haver diferença entre isolados frente às diferentes temperaturas. Os quatro isolados apresentaram um comportamento muito semelhante, no entanto o isolado de Praia Almada apresentou uma pequena variação. Todos os isolados apresentaram uma única regressão (Figura 8).



**Figura 8** – Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas.

Todos os isolados avaliados no presente trabalho apresentaram maior IVCM na temperatura de 28°C seguida pela temperatura de 25°C. Dados semelhantes foram obtidos por Dias et al. (2005), que trabalhando com *C. gloeosporioides* isolados de frutos de café, observaram que a temperatura ótima para o crescimento micelial variou entre 22°C e 28°C.

Cada fungo exige uma faixa de temperatura ideal para esporular, sendo reduzidas sob baixas temperaturas e aumentada à medida que a temperatura se eleva, até atingir um ponto máximo ou o ponto ótimo para a esporulação. Neste estudo, a temperatura ótima para o desenvolvimento de todos os isolados testados de *C. gloeosporioides* foi a de 28°C (Figura 9). Estes dados corroboram com os resultados obtidos pela Embrapa Semiárido em frutos de manga infectados por *C. gloeosporioides*, confirmando que a temperatura de 28°C é mais favorável às infecções do patógeno (BATISTA, 2010).

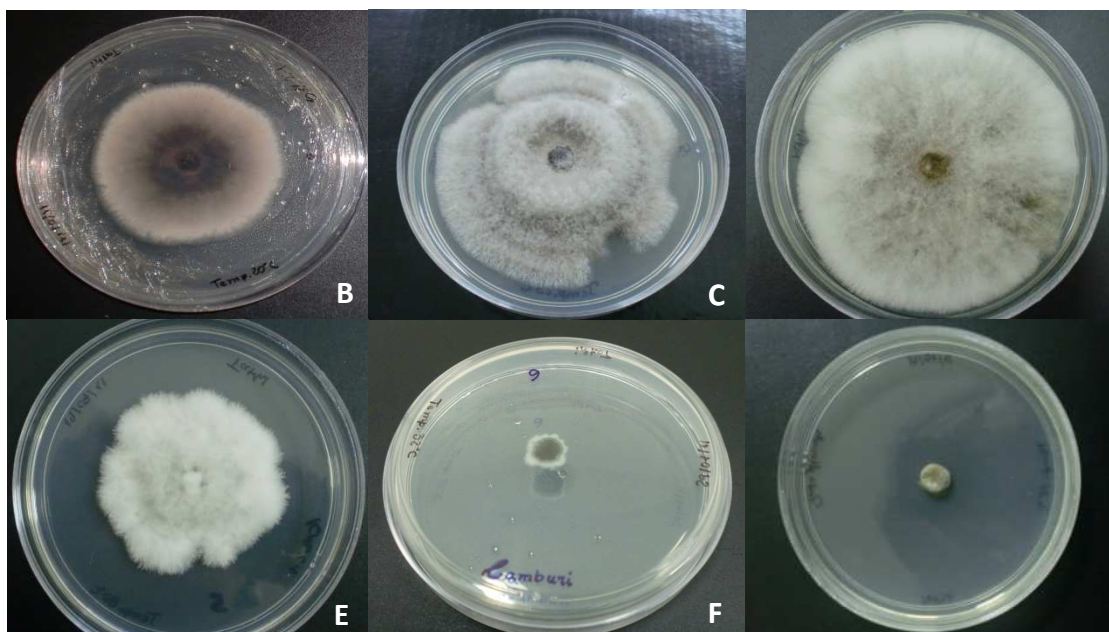


**Figura 9** – Médias de crescimento radial de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas.

O efeito inibidor da temperatura sobre o crescimento dos fungos é bastante variável, sendo que a maioria dos patógenos apresenta melhor desenvolvimento entre 20–25°C. Algumas espécies são capazes de se desenvolver em temperaturas mais elevadas (BENATO, 1999; BENATO; CIA; SOUZA, 2001) como é o caso do patossistema de *C. gloeosporioides* e juçara.

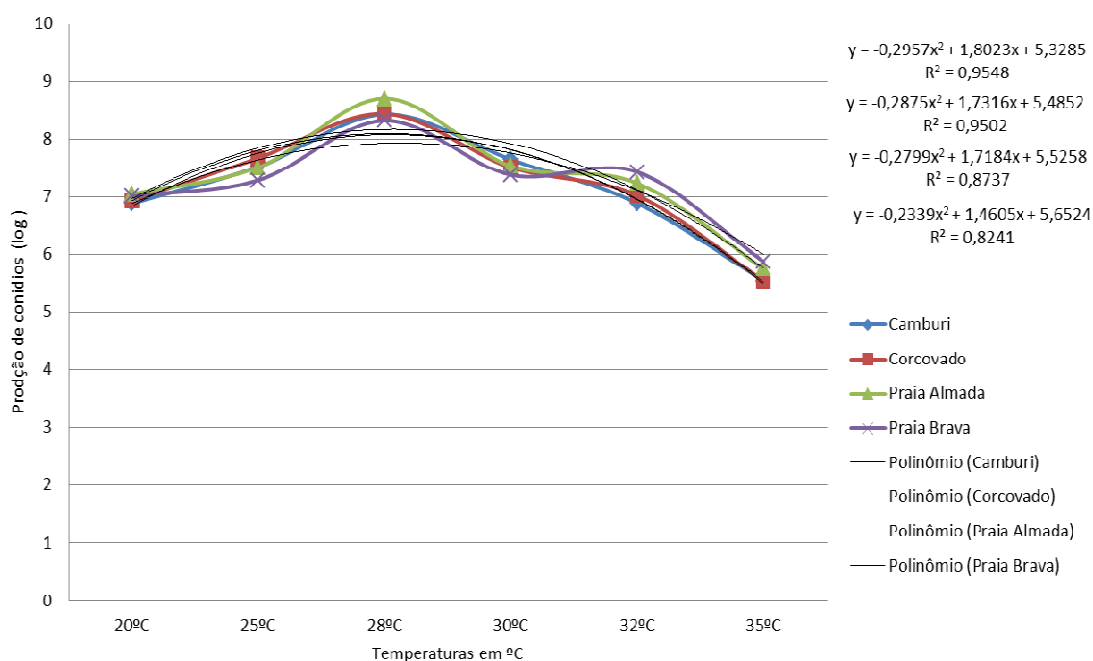
Observa-se na Figura 10 a variação pleomórfica de isolados de *C. gloeosporioides* em função da temperatura mostrando que existem diferenças significativas entre elas, sendo 28°C a melhor, proporcionando um maior crescimento micelial para todos os isolados.

Tozze Junior; Mello; Massola-Junior (2006), estudaram o crescimento de colônias de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de solanáceas. O melhor desenvolvimento das colônias ocorreu na faixa de temperatura entre 25° C e 28°C. Estes dados condizem com os resultados encontrados neste trabalho, visto que a segunda melhor temperatura encontrada foi a de 25°C. Vinnere (2004) constatou que a temperatura ótima para o crescimento de *C. gloeosporioides* encontrava-se entre 26°C e 28,5°C, sendo que a temperatura máxima para crescimento micelial foi de 35,5°C. Estes resultados vão ao encontro com os obtidos nesse estudo, visto que a temperatura de 35°C inibiu completamente o crescimento dos isolados do patógeno.



**Figura 10** – Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos às diferentes temperaturas A – Temperatura de 20°C, B – Temperatura de 25°C, C – Temperatura de 28°C, D – Temperatura de 30°C, E – Temperatura de 32°C, F – Temperatura de 35°C.

Com relação a produção de conídios, todos os isolados apresentaram temperatura ótima em 28°C, sendo a segunda melhor temperatura a de 30°C (Figura 11). Estudos realizados por Maia et al. (2011), com isolados de *C. gloeosporioides* de mangueira, mostraram que a faixa de temperatura ideal para a produção de conídios foi de 25 a 30 °C. Segundo Rollemborg (2008), a temperatura ideal para uma maior produção de conídios de *C. gloeosporioides* foi a de 28°C, confirmando os dados obtidos nesse trabalho.

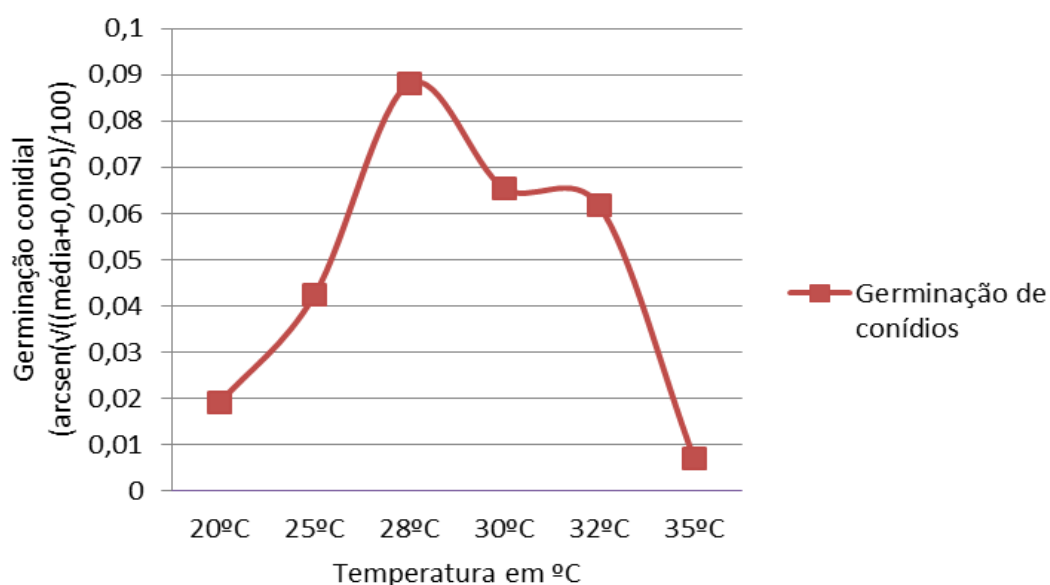


**Figura 11** - Produção de conídios de quatro isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes temperaturas

Os dados percentuais de germinação de conídios para os quatro isolados, foram transformados em arcsen ( $\sqrt{((\text{média}+0,005)/100)}$ ).

A temperatura ideal para a germinação máxima de conídios (84-87%) foi a de 28°C para todos os isolados. Maia et al. (2011) verificou que a temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* foi de 25 a 30 °C, resultado este que corrobora com o encontrado neste estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Denner; Kotzé; Putterill, (1986), que demonstraram como a temperatura afeta a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides in vitro*. A germinação dos esporos do patógeno ocorreu na faixa de temperatura de 10 a 35°C. Vários trabalhos encontrados na literatura, demonstram que temperaturas em torno de 25°C são ideais para a germinação de conídios de *Colletotrichum* sp (ROLLEMBERG, 2008). As temperaturas ótimas para a germinação de conídios das diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* variam entre os autores. Goos; Tschirsch (1962) citaram a faixa de 27-30°C, como ótima para a germinação de conídios de *C. musae*. Cox; Irwin (1988) apresentaram resultados em que o intervalo de 26-28°C foi o melhor para a germinação de *C. musae*. Segundo Wilson; Madden; Ellis, (1990), a melhor temperatura para a germinação de conídios de *C. acutatum* Simmonds, está na faixa entre 25 e 30 °C, em frutos de morango. Segundo Couto; Menezes (2004), a temperatura de 27 °C é a que mais favorece a germinação dos conídios de *C. musae*.

A Figura 12 ilustra o comportamento da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* frente às diferentes temperaturas testadas. Como os quatro isolados avaliados não apresentaram diferenças significativas entre si, a germinação pode ser demonstrada por apenas uma curva para todos os isolados. A temperatura de 28°C foi a melhor para a germinação.



**Figura 12** - Germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* de quatro isolados de palmito juçara em diferentes temperaturas

## 5 – Conclusão

Os resultados do teste de patogenicidade demonstraram ser o Complexo *Colletotrichum gloeosporioides* o agente causal desta doença, contudo ainda são necessários maiores estudos buscando a descoberta da espécie de *C. gloeosporioides* causadora da antracnose em palmeira juçara.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a temperatura ideal para o desenvolvimento micelial, produção e germinação de conídios do complexo *C. gloeosporioides* em frutos de palmeira juçara foi de 28°C.

Com relação ao crescimento micelial, o isolado Praia Almada demonstrou-se mais agressivo seguido de Corcovado, Camburi e praia Brava respectivamente.

Todos os isolados avaliados apresentaram resultados similares quando observado o número de conídios e a germinação, demonstrando não haver diferença significativa entre eles.

## 6 – Referências Bibliográficas

- ADASKAVEG, J.A.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N.F. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In.: KADER, A.A (Ed.) **Postharvest technology of crops**. 3ª ed. California: University of California Agriculture and Natural, 2002. p.163-193.
- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 021-031, 2007.
- BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. APS, St. Paul, Minnesota, 1998.p.188.
- BATISTA, D. da C. Cultivo da Mangueira – **Doenças Embrapa Semiárido Sistemas de Produção, 2 - 2ª edição Versão Eletrônica** Ago/2010 Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira\\_2ed/doenças.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/doenças.htm) . Acesso em junho 2012.
- BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.25, p.90-93, 1999.
- BENATO, E.A.; CIA, P.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutos pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.403-440, 2001.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York: John Wiley and Sons, 1990. 532 p.
- CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura, Campinas – SP, 2012. Disponível: [http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima\\_muni\\_624.html](http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_624.html) Acesso em: março de 2012
- COUTO, E.F. & MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira** v.29 p.406-412, 2004.
- COX, M.L. & IRWIN, J.A.G. Conidium and appressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, v.1, p139-144. 1988.
- CPTEC, Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/> Acesso em: maio de 2012.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J and. HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 1: 19–21, 1983.
- DENNER, F.D.N., KOTZÉ J. M.; PUTTERILL J. F. The effect of temperature on spore germination, growth and appressorium formation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Dothiorella aromatica*. **S. Afr. Avocado Grws. Assc. Yrbk.**, v. 9, p. 19 – 22, 1986.
- DIAS, M.D. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.3, 2005.
- GOOS, R.D.; TSCHIRSCH, M. Effect of environmental factors on spore germination, spore survival, and growth of *Gloeosporium musarum*. **Mycologia**, v.54 p 353-367, 1962.
- JONES, D.G. **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 460 p.



- LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 291-338, 2001.
- MAIA, F.G.M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210, Mar./Apr. 2011
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam.v98.1/3p.137-144, 1992.
- OLIVEIRA, J.A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- OLIVEIRA, R.Z.G.; BASSANEZI, R.C.; CAETANO, M.A.L. Otimização de estratégias para controle de fungos. **Biomatemática** 14, p 119-130. UNICAMP, 2004).
- OLIVEIRA, S. M. A et al. (Ed.). Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 19-44, 2006.
- REIS, D.C.; AZEVEDO, L.A.S. Manejo dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) para obtenção de polpa como uma alternativa de renda para comunidades caiçaras no município de Ubatuba, SP. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM MATA ATLÂNTICA, 1., Engenheiro Paulo de Frontin, RJ. **Resumos...** IZMA, 2010. p.33.
- ROLLEMBERG, C. de L., Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas – Dissertação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- SILVA, M.G.C.P. C., BARRETO, W.S., SERÔNIO, M.H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, **Centro de Pesquisa do Cacau – Cepec /Ceplac**, 2004. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/index.asp>. Acesso em maio de 2012-05-25.
- SILVEIRA, N. S. S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2001.
- SOARES, A. R; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento, **Tropical Plant Pathology** v.33 n.4, p. 265- 272, July – August 2008.
- SREENIVASAPRASAD, S. et al. Phylogeny and systematic of *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, v.39, p.499-512, 1996.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and it anomorph *Colletotrichum*. In: BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (eds.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, 1992. p. 1-26.
- TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.
- VIEIRA, D. G. el al. Crescimento *in vitro* de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e

refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 387-390, 2006.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology**, Uppsala, v.917, 72p., 2004.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, 82, p.218-226, 1990.

WILSON, L.L., MADDEN, L.V. & ELLIS, M.A. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology** 80:111- 116. 1990.

## Capítulo III

---

### **Avaliação de óleos vegetais na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides***

## RESUMO

A exploração da atividade biológica dos metabólitos secundários dos extratos brutos e dos óleos essenciais de plantas surge como uma forma potencial de controle de doenças de plantas. A pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta aromática da família Piperaceae, nativa da região Amazônica, com alto teor de óleo essencial (2,5 a 4%), rico em dilapiol, um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida. O cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L., Myrtaceae) destaca-se entre espécies medicinais com potencial no controle de patógenos apresentando atividade nematicida, inseticida, bactericida e fungicida. O botão floral do cravo-da-índia produz um composto fenólico volátil, o eugenol, representando em média 84,4% dos componentes do óleo essencial. O nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) vem sendo estudado por diversos autores para controle de fitopatógenos, e têm demonstrado uma eficácia incomum contra um amplo espectro de pragas. Vários componentes, principalmente os tetranortriterpenoides, têm sido identificados como os princípios ativos responsáveis por essa atividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição *in vitro* de diferentes concentrações de óleo de pimenta-de-macaco, óleo de cravo-da-índia e óleo de nim sobre o crescimento micelial de quatro isolados patogênicos de *Colletotrichum gloeosporioides* aos frutos de palmeira juçara. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com cinco repetições. Os óleos foram testados em oito concentrações (0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 MG/ML), sendo estes escolhidos em função de seu potencial fungitóxico referenciado na literatura. Os óleos testados foram adicionados em meio de cultura BDA fundente, o qual foi vertido em placas de Petri. Um disco de sete mm contendo micélio do patógeno foi colocado no centro da placa e estas submetidas à temperatura de 28°C em BOD. As mensurações do crescimento micelial foram realizadas durante sete dias por meio de medições ortogonais na placa de Petri. O óleo que apresentou melhor efeito fungitóxico foi o de cravo-da-índia, capaz de inibir completamente a partir da concentração de 500 MG/ML. O óleo de *P. aduncum* apresentou inibição em todas as concentrações testadas, no entanto apenas na concentração de 1500 µg/ml apresentou inibição total do crescimento micelial. O óleo de nim apresentou inibição parcial em todas as concentrações testadas.

**Palavras-chave:** Controle alternativo, antracnose, óleos essenciais, *Piper aduncum*, *Caryophyllus aromaticus*, *Azadirachta indica*.

## ABSTRACT

The exploitation of biological activity of secondary metabolites of higher extracts and essential oil plants emerge as potential control of plant diseases. The spiked pepper (*Piper aduncum* L.) is an aromatic plant Piperaceae, native to the Amazon region with the highest essential oil content (2.5 to 4%), rich in dilapiol, a phenolic ether which was successfully tested as a fungicide. The clove (*Caryophyllus aromaticus* L., Myrtaceae) stands out among medicinal plants with potential to control pathogens that show activity nematocide, insecticide, bactericide and fungicide. The button of the floral clove produces a volatile phenolic compound, eugenol, which is about 84.4% of essential oil compounds. The neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) has been studied by several authors on plant pathogen's control and showed an uncommon efficacy against a broad spectrum of plagues. Several components, especially tetranortriterpenoids were identified as active ingredient that has this activity. The objective of this study is to evaluate the effect of inhibition in vitro of different concentrations of spiked pepper oil, clove oil and neem oil on mycelial growth of four strains of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic to fruits of palm juçara. The test experiment was a randomized block design and five replicates. The oil was tested with eight concentrations (0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 and 1500 µg/ml) to be selected for their fungitoxic potential known from the literature. The oil tested was added to culture media PDA flux, which was converted to a Petri dish. A disc with seven mm with pathogen mycelium was placed at center of dish and transferred to a BOD ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). Growth measurement was made during seven days by octognal measurement of petri dish. The oil which showed a better fungitoxic effect was of clove, able to inhibit completely from 500 µg/ml. The oil of *P. aduncum* showed inhibition on all concentration tested, however only concentration of 1500 µg/ml it showed total inhibition to mycelia growth. The neem oil showed partial inhibition on all concentration tested.

**Key words:** Alternative control, anthracnose, essential oils, *Piper aduncum*, *Caryophyllus aromaticus*, *Azadirachta indica*.

## 1 – Introdução

A diversidade da flora brasileira, em especial a da região Amazônica, apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários de plantas, que têm sido demandadas continuamente pela indústria nas últimas décadas, devido ao incremento da utilização de produtos naturais na agropecuária.

Estima-se a existência de 500 mil espécies de plantas no mundo, sendo 16% delas encontradas na floresta amazônica. No entanto, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas no Brasil ainda é muito incipiente. Mesmo considerando-se os incrementos significativos da pesquisa nas últimas décadas, há evidentemente, uma grande lacuna de conhecimento da nossa flora a ser preenchida (FAZOLIN et al., 2006).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto aquoso (obtido por maceração infusão ou decocção) ou alcoólico (tintura ou maceração) e óleo essencial (e seu hidrolato), obtido a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de conídios, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitador(es) (SCHWAN-ESTRADA; SUZUKI; ITAKO, 2008).

As plantas tropicais são uma fonte considerável de metabólitos secundários e de componentes químicos com diferentes propriedades biológicas (SBRAGIA, 1975). Apesar de a grande maioria das informações disponíveis na literatura tratarem do controle de insetos, algumas publicações relevantes ressaltam o efeito de resíduos e extratos de plantas e seus óleos essenciais no controle de fitopatógenos (CHALFOUN; CARVALHO, 1987; BOWERS et al., 1993; PANDEY; DUBEY, 1994; MAGALHÃES; ARAUJO; COUTINHO, 1996; BASTOS, 1997).

Embora a literatura relate vários casos de controle de doenças pelo uso de óleos essenciais e extratos aquosos de diversas plantas, não são encontrados estudos de métodos alternativos de controle da antracnose em frutos de palmeira juçara, causados por *C. gloeosporioides*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Desta forma, este trabalho objetivou estudar o efeito fungitóxico dos óleos de pimenta-longa ou pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), e nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre o crescimento micelial de quatro isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de quatro locais diferentes dos municípios de Paraty – RJ e Ubatuba - SP.

## 2 – Revisão Bibliográfica

### 2.1 A Antracnose

A antracnose que possui como agente causal o fungo pertencente ao gênero *Colletotrichum* sp. pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores cultivar suscetível, ambiente favorável ao patógeno e sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo (SILVA, 2004). A disseminação de planta a planta se dá principalmente através dos respingos de chuva, pois os conídios estão aglutinados por uma substância gelatinosa hidrossolúvel e não são facilmente carregados pelo vento. Os conídios uma vez em contato com o hospedeiro, sob condições de umidade, germinam e o pro-micélio resultante, com prévia formação de apressório, penetra diretamente através da cutícula pela emissão do tubo de infecção (GALLI et al., 1978).

Ela é a principal doença de frutos em pós-colheita nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, como a banana (*Musa* spp.), o caju (*Anacardium occidentale* L.), a manga (*Mangifera indica* L.), o mamão (*Carica papaya* L.) e o maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) entre outros. (BENATO, 1999; PERES et al., 2002). O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas e bordos ligeiramente elevados com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA; GASPOROTO; SANTOS, 1993). Quando avaliamos o ataque ao fruto de juçara nota-se a perda da polpa presente no fruto e é observado também a não germinação da semente, o que pode acabar contribuindo para a extinção da espécie, exatamente o que buscamos evitar.

A antracnose uma doença causadora de grandes prejuízos em espécies florestais. Pela inexistência de produtos químicos sintéticos registrados para uso nessas espécies, há a necessidade de formas alternativas para o controle de microrganismos fotopatogênicos. Tendo como base os princípios ativos presentes nas plantas, estudos a fim de avaliar uma possível ação fungitóxica são de suma importância no manejo da doença (CASTRO et al., 2006).

A antracnose da palmeira juçara é causada pelo complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, hoje considerado uma espécie-complexo que apresentam formato lobado segundo Sutton 1992 *apud* (GUIMARAES; PAZ-LIMA, 2010). Complexo este que, provavelmente, abriga diferentes espécies não resolvidas que buscam maiores estudos para diferenciação (WACULICZ-ANDRADE, 2009).

### 2.2 Controle Alternativo

Visando minimizar os efeitos negativos do uso de agrotóxicos e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando assim o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e/ou sustentável, têm-se buscado novas medidas de proteção de plantas contra as doenças (SCHWAN-ESTRADA; SUZUKI; ITAKO, 2008) A agricultura alternativa preconiza o uso do controle alternativo de doenças de plantas, que inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991; STANGARLIN et al., 1999).

A agricultura alternativa tem usado, de forma empírica, os extratos de plantas para o controle de doenças e pragas, por considerar a relativa inocuidade desses produtos, os quais são, muitas vezes, feitos de forma caseira e pulverizados nas lavouras. Um grande número de plantas apresenta propriedades antifúngicas em seus extratos. Essas propriedades são

dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgão utilizado, idade e estágio vegetativo, bem como fatores do ambiente como o pH do solo, estação do ano e diferentes tipos de estresse também devem ser observados. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do extrato (SILVA et al., 2005).

Um extrato vegetal pode ser entendido como o produto obtido pela passagem de um solvente, como a água ou o álcool etílico através da planta moída ou não, de modo a se retirar os princípios ativos nela contidos (STADNIK; TALAMINI, 2004).

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos, obtidos a partir de plantas medicinais conhecidas, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitor(es). O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobianas poderá contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doenças de plantas (SCHWAN-ESTRADA, 2002).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, e México, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais. No Brasil, entretanto, apesar da rica biodiversidade, até 2005 só existiam disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas (DUARTE et al., 2005).

As propriedades antimicrobianas de extratos de plantas provenientes de várias espécies têm sido comprovadas por afetar o desenvolvimento fungico *in vitro* e *in vivo* (MONTES-BELMONT et al., 2000; BOWERS; LOCKE, 2000). O crescimento micelial, a formação e a germinação de esporos, e a infecção podem, às vezes, ser estimulados ou inibidos por extratos de plantas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003).

Os trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fungos fitopatogênicos. Dentre essas plantas pode-se citar: capim citronela (*Cymbopogon nardus*), copaíba (*Copaifera reticulata*), andiroba (*Carapa guianensis*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), boldo (*Prunus boldus*), alecrim-pimenta (*Lippia siloides*), pimenta de macaco (*Piper aduncum*) e outras espécies de *Piper* (BASTOS, 2008).

A atividade biológica de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) é muito diversificada, são consideradas grandes produtoras de óleos essenciais. A espécie de *P. aduncum* L., conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, é uma excelente produtora de óleo essencial, o qual possui alto teor de éter fenílico dilapiol nos galhos finos e folhas (GOTTLIEB et al., 1981; MAIA et al., 1998 *apud* BASTOS, 2008 ).

Vários estudos já foram realizados para avaliar a eficiência de extratos de plantas e óleos essenciais no controle da antracnose em frutos causada por *C. gloeosporioides*, embora nenhum deles sobre frutos de palmeira juçara. Como exemplo, cita-se o extrato aquoso de folhas de hortelã-pimenta incorporado em BDA, a partir da concentração de 200 µg/ml, demonstrou efeito inibitório sobre *C. gloeosporioides*, em mamão (*Carica papaya* L.) (RIBEIRO; BEDENDO, 1999). O crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, em manga, foram totalmente inibidos por extratos de *Adenocalyma alleaceum* Miers e *Bougainvillea spectabilis* Willd (PRABAKAR et al., 2003). O extrato de cravo-da-



índia inibiu em 100% o crescimento micelial e a germinação de esporos de um isolado de *C. gloeosporioides* em goiaba (*Psidium guajava* L.) (ROZWALKA, 2003), bem como aplicado a 2,5% em frutos propiciou os melhores resultados na redução da doença (ROZWALKA et al., 2008). Alecrim pimenta e utinga inibiram 100% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro (FEITOSA; CARVALHO; CARVALHO, 2007). O extrato de aroeira inibiu completamente a ação de *C. gloeosporioides*, em mangueira (*Mangifera indica* L.) (LIMA et al., 2010).

Em relação à utilização de óleos essenciais cita-se como efeito fungicida, o óleo de cravo-da-índia que apresentou efeito fungitóxico inibindo 100% do crescimento de *C. gloeosporioides* em mangueira (*Mangifera indica* L.) (LIMA et al., 2010). Em concentrações acima de 100 µg/ml, o óleo essencial de *P. aduncum* inibiu em 100 % o crescimento micelial e a germinação *in vitro* de conídios de *Colletotrichum musae*, agente causal da podridão dos frutos em bananeira (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

Os óleos essenciais de *P. hispidinervium*, *P. aduncum* e *Copaifera langsdorfii* (copaíba) foram testados *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de frutos de coqueiro (*Cocos nucifera*). Inibiram seu crescimento micelial em 80%, 67 % e 49 % respectivamente (FECURY et al., 2006a, 2006b). O efeito do extrato de cravo-da-índia foi também estudado em diferentes concentrações *in vitro* para o controle de *C. gloeosporioides* e outros patógenos. Foi possível observar a inibição total do crescimento micelial dos fitopatógenos testados na presença do extrato de cravo-da-índia em pimenta-do-reino (COSTA, 2006). Segundo Marques et al., (2003) óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Staph) foi eficiente na inibição total *in vitro* e *in vivo* do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em frutos do mamoeiro. Testes realizados por Pierre (2009), demonstraram que o óleo e o extrato de cravo-da-índia inibiram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* atacando café, porém o óleo apresentou melhor ação sobre o fungo.

Nesta pesquisa buscou-se atender a necessidade de métodos de controle da doença para a palmeira juçara e atender demanda crescente e urgente por tecnologias naturais, limpas e seguras para o tratamento pós-colheita dos frutos, pois atualmente os consumidores estão mais conscientes e exigentes e o mercado Internacional vem restringindo cada vez mais o Limite Máximo de Resíduos (LMR), impondo monitoramento rigoroso e barreiras não alfandegárias à comercialização dos frutos nacionais. A utilização dos óleos como método alternativo, possibilita uma diminuição nos gastos além de tratar-se de produtos biodegradáveis e que possibilitam o controle de doenças e normalmente não afetam o poder germinativo das sementes, podendo assim tentar a retirada da palmeira juçara da lista de risco de extinção.

Segundo Terão, (2012) atualmente se utiliza agrotóxicos no tratamento pós-colheita de frutas, de forma indiscriminada e muitas vezes empírica, com o agravante, em alguns casos, do uso de produtos não registrados para a cultura, provocando a contaminação química da fruta, podendo ocasionar o aparecimento de raças resistentes de fitopatógenos, tornando o seu controle cada vez mais ineficiente.

### 2.3 Óleos Vegetais Utilizados

O nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.), originário da Índia e pertencente à família Meliaceae, tem sido estudado por diversos autores para controle de fitopatógenos (MELLO; LOURENÇO; AMORIM, 2005; PIGNONI; CARNEIRO, 2005; CARNEIRO, 2003; NEVES et al., 2003). Segundo Costa (2009), substâncias obtidas de diversas partes dessa árvore (caule, folhas e sementes) têm demonstrado uma eficácia incomum contra um amplo espectro de

pragas. Vários componentes, principalmente os tetranortriterpenoides, têm sido identificados como os princípios ativos responsáveis por essa atividade. Por causa da sua eficácia, da biodegradabilidade e dos efeitos indesejáveis mínimos, a azadiractina, um tetranortriterpenoide obtido a partir de sementes de nim, tem sido apontado como biopraguicida. Diferentes formulações de óleo de nim estão comercialmente disponíveis para o uso agrícola.

O plantio do nim está crescendo rapidamente no Brasil, com o objetivo de exploração da madeira e também para a produção de folhas e frutos, de onde se retira a matéria-prima para produtos inseticidas, para uso medicinal, veterinário ou na indústria de cosméticos (MARTINEZ, 2002).

Além dos diversos usos já citados, o nim tem apresentado potencial para o controle de patógenos de plantas, e tem sido estudado para essa finalidade por pesquisadores de alguns países (CARNEIRO, 2003). Vários trabalhos referem-se ao efeito de derivados do nim como inibidores do crescimento de fungos (AMADIOHA, 2000); contudo, pouco se conhece da ação de extratos de nim sobre fungos fitopatogênicos (MORAES et al., 2009).

A maioria dos trabalhos publicados visou o controle de doenças em culturas importantes na Europa e Ásia, sendo poucos os estudos em espécies de interesse para o Brasil. Considerando que o efeito do nim sobre fungos é variável e depende, entre outros fatores, da dose, da época de pulverização, do patógeno alvo e da forma de extração/produção do subproduto do nim, novos estudos estão sendo realizados (CARNEIRO, 2008).

A pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta aromática da família Piperaceae, nativa da região Amazônica (SILVA, 2004). O óleo desta piperácea é rico em dilapiol, com comprovada ação fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida com a vantagem de ser um produto biodegradável (BASTOS, 1997; SILVA, 2004).

O *P. aduncum* pode ser encontrado desde o nível do mar até altitudes consideráveis. Sua distribuição geográfica se dá na América Central, Antilhas e América do Sul. No Brasil, é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Mato Grosso, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (FAZOLIN et al., 2006). É uma espécie de cultivo, considerada de grande potencialidade para o desenvolvimento regional por ser uma fonte sustentável de matéria-prima química, podendo ser industrializada tanto em pequena quanto em grande escala. O interesse pelo uso dessa espécie pode estar relacionado à sua ocorrência espontânea, sendo considerada como planta invasora de áreas alteradas pelo homem, como por exemplo, terrenos, beira de estradas e áreas recém-desmatadas (FAZOLIN et al., 2006).

Óleo de pimenta-de-macaco mostrou-se eficiente no controle de *Colletotrichum musae* em frutos de banana em pós-colheita (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004). Silva e Bastos (2007) também verificaram ação inibitória com óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre o crescimento micelial dos fungos *Crinipellis pernicioso*, e dos pseudofungos *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, além de reduzir a germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso*. Segundo Lobato et al. (2007), o óleo essencial desta planta na concentração de 0,5%, apresentou melhor custo/benefício e não foi fitotóxico à germinação das sementes, além de reduzir os fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Macrophomina phaseolina* associados às sementes de caupi (*Vigna unguiculata*).

Segundo Fazolin et al. (2006), a composição do óleo essencial de *P. aduncum*, coletada em diferentes locais da Região Amazônica, aponta o dilapiol, um éter fenílico, como seu componente mais abundante. Existem variedades desta espécie com teores de dilapiol próximos a 90%. Outras substâncias como sarisan e safrol, com bioatividade comprovada e apresentando

em suas estruturas químicas o grupo metilenodioxifenil, são produzidas em menor quantidade junto com o dilapiol.

O cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) é uma árvore nativa das ilhas Molucas, na Indonésia. Atualmente, é cultivado em outras regiões do mundo, como as ilhas de Madagascar e de Granada (MAZZAFERA, 2003). O botão floral do cravo-da-índia produz um composto fenólico volátil, o eugenol. Segundo Ferrão (1993), o eugenol representa, em média, 84,4% dos componentes do óleo essencial de cravo-da-índia. Seu nome foi sugerido pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) e é 4-alil-2-metoxifenol. É um composto fenólico volátil, que é utilizado tanto pelas suas atividades medicinais como para cosméticos. De sabor picante e agradável é muito utilizado na indústria alimentícia (MARTINS; CORTEZ; FELIPE, 2008).

O cravo-da-índia destaca-se entre espécies medicinais com potencial no controle de patógenos apresentando atividade nematicida, inseticida, antiviral, bactericida e fungicida (YUKAWA et al., 1996; WALKER; MERLIN, 1996; OUATTARA et al., 1997; EL-HAG et al., 1999; DELESPAUL et al., 2000; DORMAN; DEANS, 2000; NASCIMENTO et al., 2000 e TSAO; YU, 2000) *apud* MAZZAFERA (2003).

O eugenol, um dos principais constituintes do óleo essencial presente na especiaria possui amplo espectro de ação contra fungos como *Aspergillus niger*, *Saccharowyces cerevisiase*, *Candida albicans*, e bactérias como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus* tem ação cicatrizante e analgésico (DELESPAUL; BILLERBECK, 2000).

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em extratos ou óleos essenciais de plantas medicinais pode constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (BIZI, 2006).

A seleção de novas espécies vegetais a partir do conhecimento prévio de seu uso na medicina popular regional aumenta a chance da descoberta de componentes bioativos com propriedades fungicidas. No entanto, estudos químicos aprofundados e a elaboração de produtos naturais seguros e com controle de qualidade são necessários para que o Brasil possa fazer uso de forma consistente de sua rica biodiversidade. Há registros de que até 2005, menos de 1% da flora medicinal brasileira foi estudada em profundidade, fazendo com que haja um campo aberto para estudos multidisciplinares aplicados na geração de tecnologias seguras (SILVA et al., 2005).

### 3 – Materiais e Métodos

#### 3.1 Delineamentos Experimentais

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Entomologia e Fitopatologia do Instituto de Biologia, Seropédica – Rio de Janeiro, no período de Agosto de 2011 a fevereiro de 2012. Os experimentos foram delineados em blocos ao acaso, nos dois primeiros ensaios, usando oito tratamentos (concentrações), em quatro locais de coleta (isolados) cada um com cinco repetições, o terceiro ensaio consistiu em nove tratamento (concentrações), em quatro locais de coleta (isolados) cada um com cinco repetições. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAEG. Foram avaliados os diferentes níveis de inibição de cada concentração dos diferentes óleos para cada isolado.

Foram testados os óleos essenciais de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.; Piperaceae), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.; Myrtaceae), e nim (*Azadirachta indica* A. Juss; Meliaceae). O óleo de *P. aduncum* foi cedido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). As plantas são cultivadas e produzidas na Estação Experimental de Recursos Genéticos de Cacau (ERJOH) da CEPLAC, município de Marituba PA. Folhas e ramos dos materiais botânicos, depois de colhidos no campo, foram colocados para secar à temperatura ambiente e submetidos à hidrodestilação por arraste de vapor em aparelho de vidro tipo Clevenger para separação do óleo essencial, e em seguida foi centrifugado e seco na presença de sulfato de sódio anidro (BASTOS, 2007). O óleo de nim emulsionado foi cedido pela empresa Agrobiológica Soluções Naturais para a condução do projeto e o óleo de cravo-da-índia foi obtido junto à Indústria FERQUIMA, com origem na Indonésia apresentando 83% de eugenol.

Em todos os experimentos foram utilizados isolados monospóricos de *C. gloeosporioides*, obtidos de frutos de palmeira juçara apresentando sintomas típicos de antracnose. Foram coletados em quatro diferentes áreas entre Paraty-RJ e Ubatuba-SP. O isolado foi produzido em placas de Petri de plástico estéril contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As quais foram incubadas em BOD por sete dias com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Os diferentes óleos essenciais foram adicionados ao meio (BDA) batata, dextrose e ágar (aproximadamente 45 a 50°C), a fim de se obter concentrações de 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/ml para cada um dos quatro isolados testados. Cada concentração representou um tratamento, sendo a concentração 0 (somente BDA) as testemunhas, em um total de oito tratamentos. O experimento foi repetido duas vezes para uma maior consistência de dados. Um terceiro ensaio foi realizado, onde os óleos foram adicionados a álcool etílico 98%, sendo a quantidade de álcool na quantidade de 7/1 de óleo e posteriormente acrescentados ao meio BDA, com o objetivo de se observar a ação de diluição do óleo com o álcool. Nesse experimento as concentrações foram as seguintes: 0, álcool, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/ml, para cada um dos quatro isolados avaliados .

A partir de colônias de *C. gloeosporioides* obtidas das quatro localidades: Camburi, Corcovado, Praia Almada e Praia Brava, com sete dias de idade, crescidas em placas de Petri com BDA, sob fotoperíodo positivo com regime de luz de 12 horas em câmaras de BOD, foram obtidos discos de micélio de 0,7mm de diâmetro. Estes discos foram individualmente transferidos para o centro de cada uma das placas, de cada localidade e de cada tratamento. A seguir as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas. A incubação do ensaio foi realizada em câmaras de BOD, sob fotoperíodo positivo com regime de luz de 12 horas e uma

temperatura de 28°C, por um período de sete dias. Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas por repetição.

## **3.2 – Avaliação**

### **3.2.1 Avaliação do crescimento radial**

Avaliou-se o efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial foi realizada por meio da mensuração do diâmetro médio das colônias em dois sentidos perpendiculares radiais, sendo posteriormente calculada uma média das colônias. A avaliação foi realizada diariamente por sete dias.

### **3.2.2 Avaliação da produção de conídios**

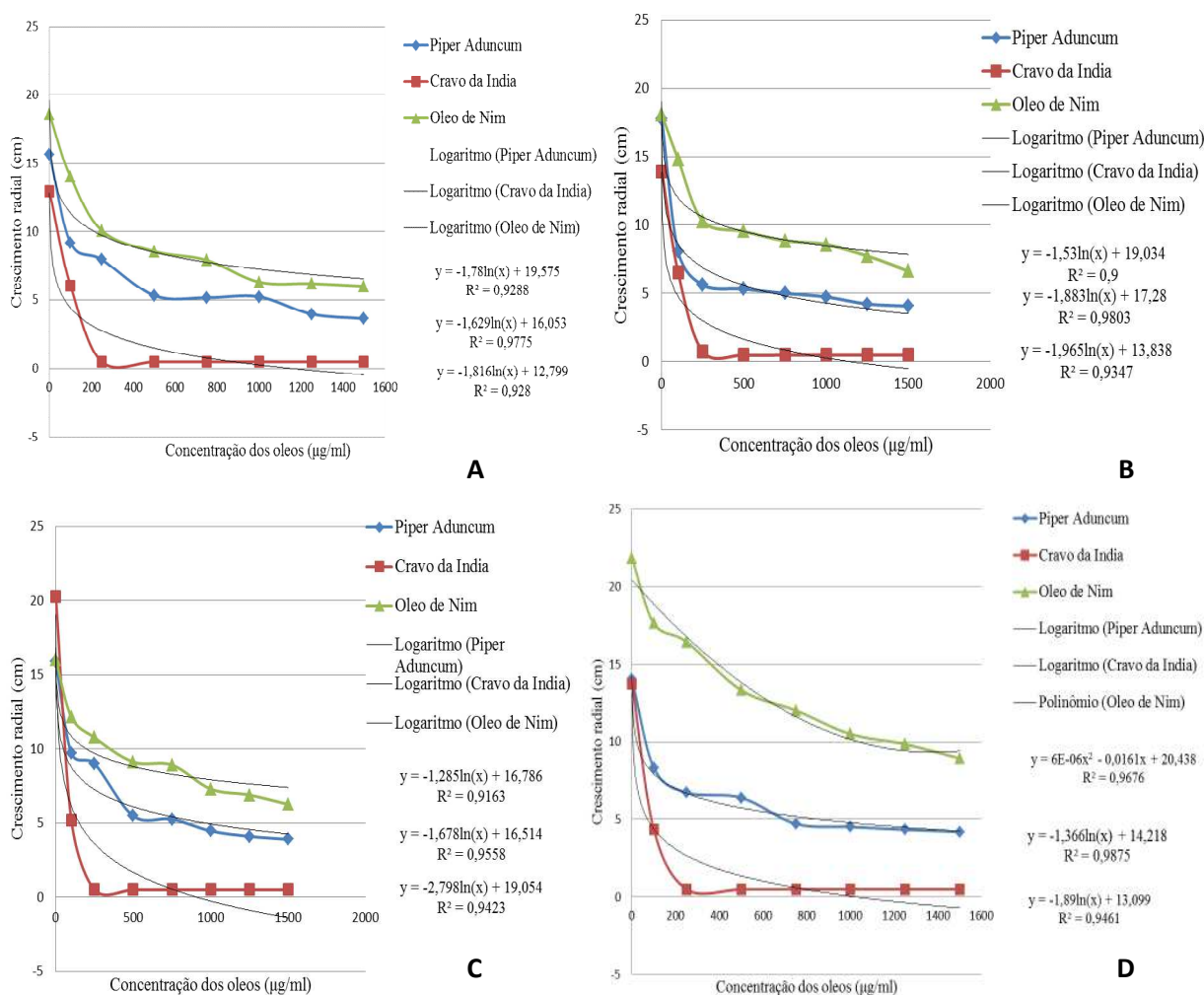
Realizou-se no sétimo dia, para a determinação da produção de conídios, uma suspensão, com a mesma quantidade de água por placa (dois mL) e o auxílio de uma alça de Drigalski, oito lâminas por isolado foram avaliadas através da contagem do número de conídios com o auxílio da câmara de Newbauer.

#### 4 - Resultados e Discussão

Para os isolados, diferenças significativas foram observadas para todas as fontes de variação (bloco, óleo, dose, dia, interação óleo e dose, interação óleo e dia e interação dose e dia), ou seja, em cada óleo, em cada dose e em cada dia, os isolados *C. gloeosporioides* se comportam de forma diferente em relação ao crescimento micelial. Todos os ensaios avaliados apresentaram resultados muito similares.

A Figura 13 ilustra que todos os óleos avaliados apresentaram inibição do crescimento micelial. O cravo-da-índia foi o mais eficiente, pois causou inibição de 100% do crescimento micelial na concentração de 250 µg/ml em todos os quatro isolados avaliados.

Na presença dos óleos de *Piper aduncum* e de nim foi observada uma resposta à dose, isto é, à medida que se aumenta a concentração aumenta a porcentagem de inibição, porém sem a completa inibição em nenhuma das concentrações avaliadas.



**Figura 13** – Diâmetro da colônia dos isolado A – Camburi, B – Corcovado, C- Praia Almada e D- Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* em doses crescentes de óleos essenciais de *Piper aduncum*, cravo-da-índia e nim.

Em comparação com o isolado Camburi, o isolado Corcovado apresentou-se mais virulento em relação ao crescimento micelial e ao controle. O isolado da Praia Almada apresentou um comportamento similar ao isolado de Camburi, sendo menos virulento em

relação ao crescimento micelial e ao controle. Resultado semelhante foi encontrado no isolado Praia Brava.

Na Tabela 1 os resultados apresentados mostram que houve diferenças significativas entre as doses nos quatro isolados avaliados. É possível observar que houve diferença significativa entre as doses de 0, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml para os quatro isolados, não houve diferenças significativas entre 750 µg/ml e 1000 µg/ml, 1000 µg/ml e 1250 µg/ml e 1250 µg/ml e 1500 µg/ml nos isolados de Camburi, Corcovado e Praia Brava, O isolado de Praia Almada não apresentou diferença significativa entre as doses de 750 µg/ml e 1000 µg/ml, contudo entre as doses de 1000 µg/ml, 1250 µg/ml e 1500 µg/ml houve diferença significativa.

**Tabela 1** – Média de inibição do crescimento micelial *in vitro* do isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de diferentes concentrações de óleo de *Piper aduncum*, cravo-da-índia e óleo de nim.

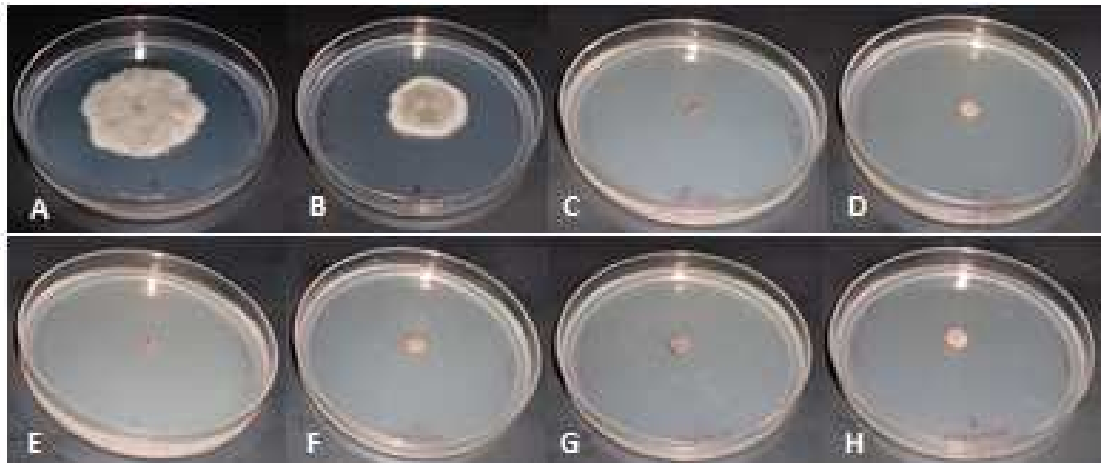
DOSE	Camburi	Corcovado	Praia Almada	Praia Brava
<b>Testemunha</b>	18,9586 <sup>a</sup>	18,9586A	15,0749A	19,8572 <sup>a</sup>
<b>100 µg/ml</b>	9,8862B	9,8862B	10,2888B	9,9063B
<b>250 µg/ml</b>	7,5784C	7,5784C	6,7733C	6,1801C
<b>500 µg/ml</b>	5,9766D	5,9766D	4,6190D	4,7428D
<b>750 µg/ml</b>	4,8757E	4,8757E	4,0549E	4,0539E
<b>1000 µg/ml</b>	4,2880EF	4,2880EF	4,0176E	3,3687F
<b>1250 µg/ml</b>	3,4999FG	3,4999FG	3,1117F	3,0845FG
<b>1500 µg/ml</b>	2,7079G	2,7079G	2,4968G	2,6175G
<b>CV (%)</b>	41,5	26,72	31,526	31,645

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade

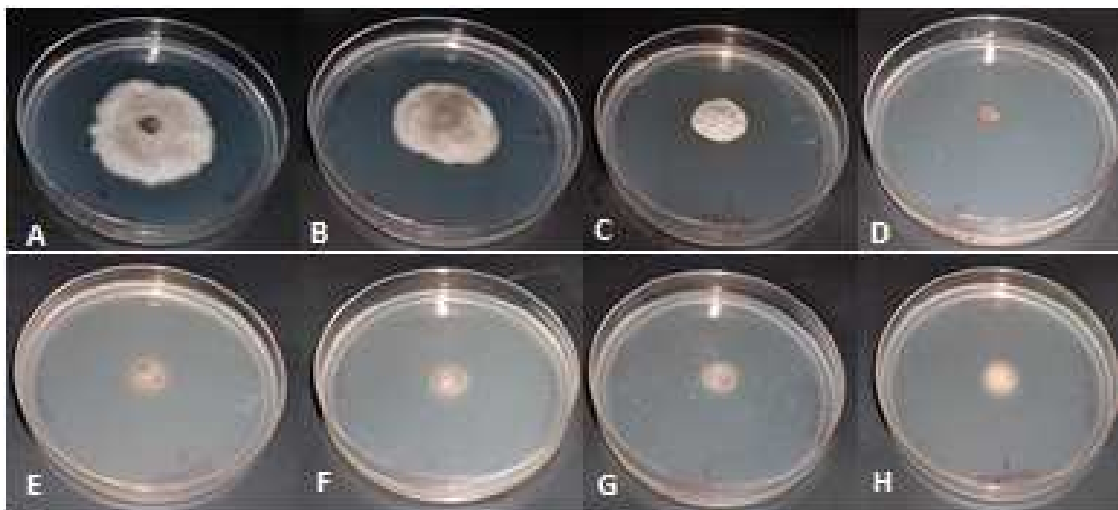
\*\* Média das diferentes doses dos três óleos testados.

Os óleos essenciais extraídos de plantas representam um potencial natural no controle integrado de doenças de fruteiras, visto que resultados de pesquisas recentes têm mostrado a eficiência desses óleos no controle de diversos patógenos (CIMANGA et al., 2002; PUPO et al., 2003).

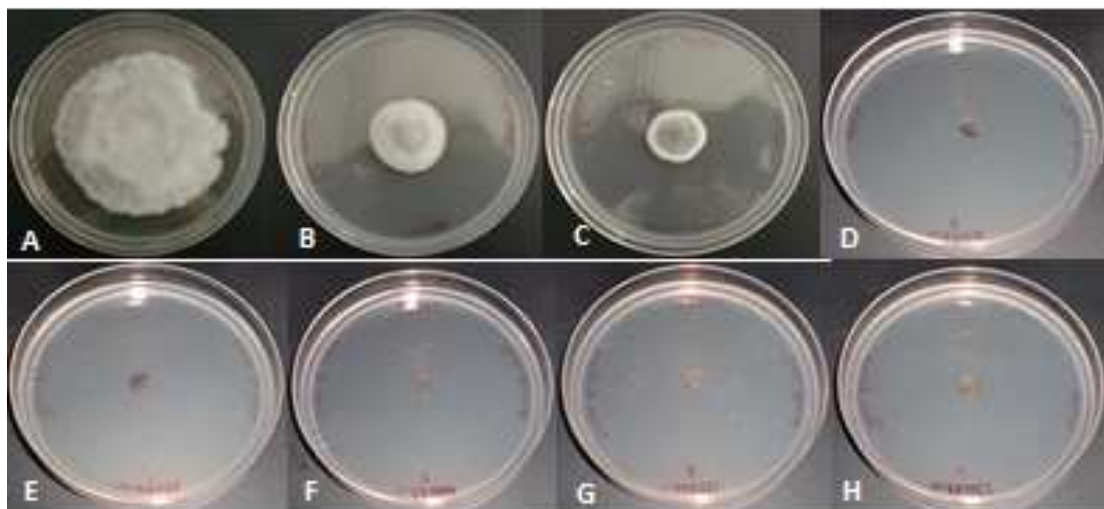
O óleo de cravo-da-índia de uma forma geral inibiu 100% o crescimento micelial dos quatro isolados em concentrações que variaram de 250 a 750 µg/ml, sendo observada uma redução do crescimento micelial, a partir da concentração de 100 µg/ml (Figuras 14, 15, 16 e 17). Os resultados obtidos por PIERRE (2009) demonstraram que o óleo de cravo-da-índia é um produto potencial no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* na cultura do café, dados estes que confirmam a eficiência do óleo.



**Figura 14** – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

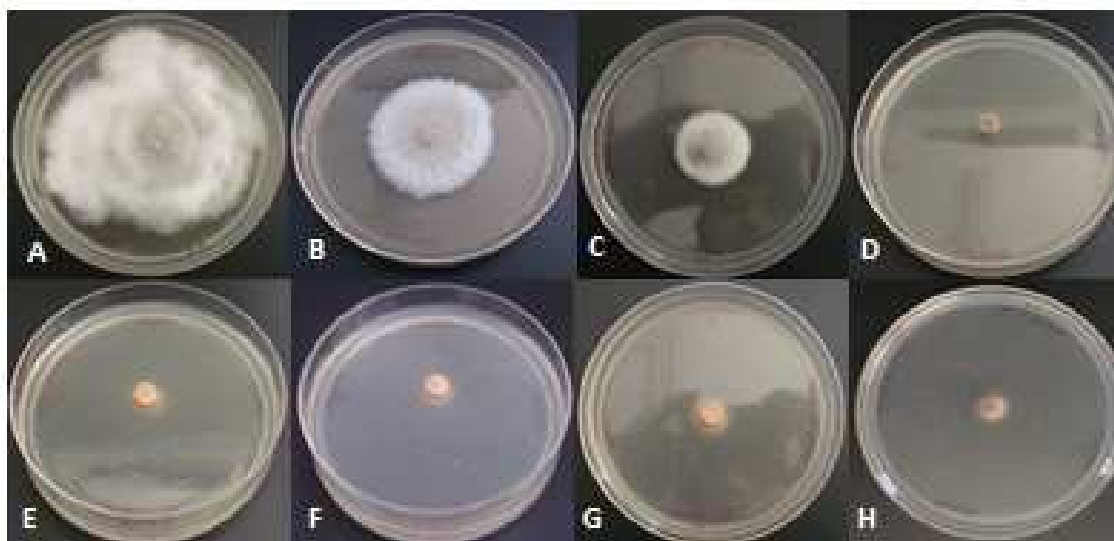


**Figura 15-** Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.



**Figura 16** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.





**Figura 17** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de cravo-da-índia sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

Buffon et al. (2010) relataram que o óleo de cravo-da-índia na concentração de 80%, causou uma inibição de 100% no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* provenientes de pimenta-malagueta. Venturoso; Bacchi; Gavassoni, (2011a) constataram que o óleo de cravo-da-índia apresentou uma atividade antifúngica total sobre os patógenos: *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp.

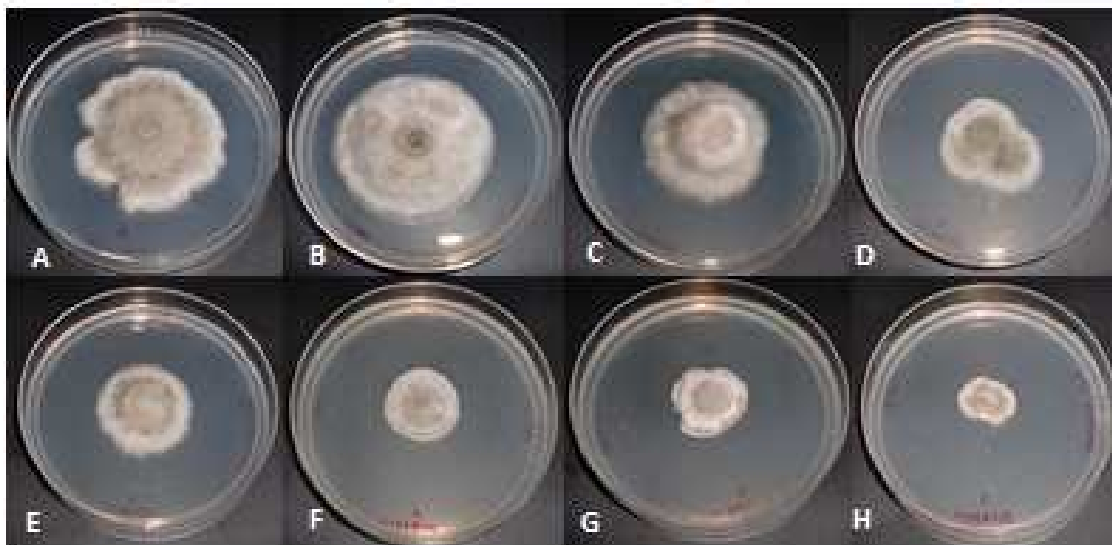
Estudos realizados por Benchimol et al. (2008) demonstraram a inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* em pimenta-do-reino pela ação do óleo de cravo-da-índia nas concentrações de 2000 e 3000 µg/ml. Venturoso et al. (2011b) avaliaram o extrato aquoso de cravo-da-índia no crescimento de *Colletotrichum* sp. e constataram que a partir da concentração de 7,4% houve inibição do crescimento micelial, confirmando os dados encontrados neste trabalho.

Os resultados obtidos por Lima et al. (2010) confirmaram que o óleo de cravo-da-índia apresentou uma tendência de redução no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em mangueira com altas concentrações do óleo. Resultados similares foram também obtidos por Rozwalka et al. (2008), que obtiveram total inibição do crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba com o uso do extrato aquoso de cravo-da-índia na concentração de 10%. Segundo Santos et al. (2007), o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, na concentração de 500 µg/ml, causou uma inibição de 100% de índice de crescimento micelial para os fungos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*.

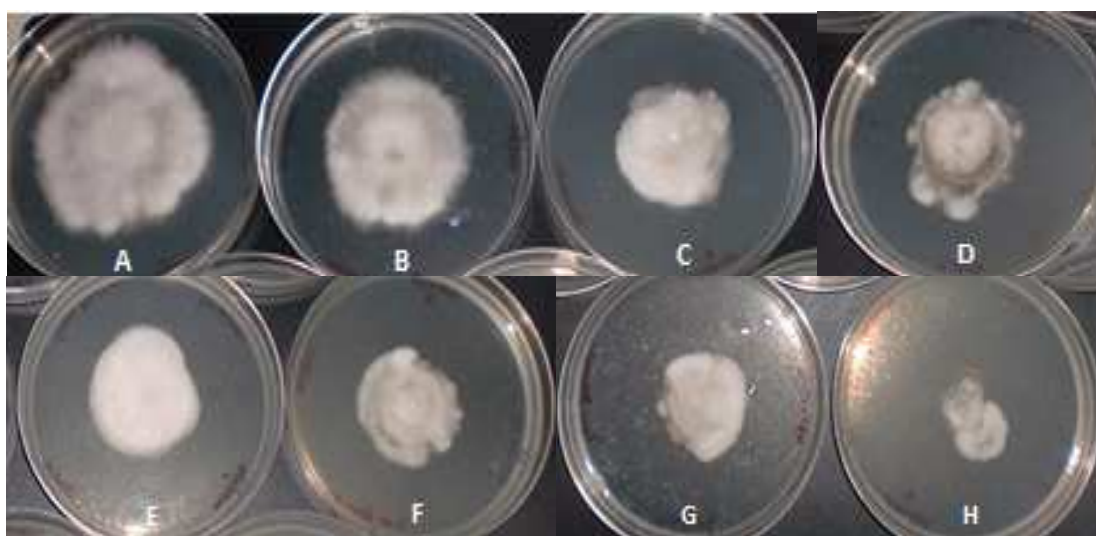
Melo et al. (2009) avaliaram a ação do óleo de cravo-da-índia em *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, os resultados indicaram 100% de inibição do crescimento fúngico na concentração de 400 µg/ml. Pinto et al. (2010), relataram que o óleo essencial de cravo-da-índia e tomilho em três concentrações inibiu completamente *Colletotrichum gloeosporioides* em manga. Os resultados apresentados por Silva et al. (2012) demonstraram que o extrato aquoso de cravo-da-índia, controlou em 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* f. sp *vasinfectum* e *P. oryzae*.

O óleo de *P. aduncum* foi o segundo melhor óleo para o controle dos quatro isolados de *C. gloeosporioides*, sendo sua ação fungitóxica parcial na inibição do crescimento micelial (Figuras 18, 19, 20 e 21).

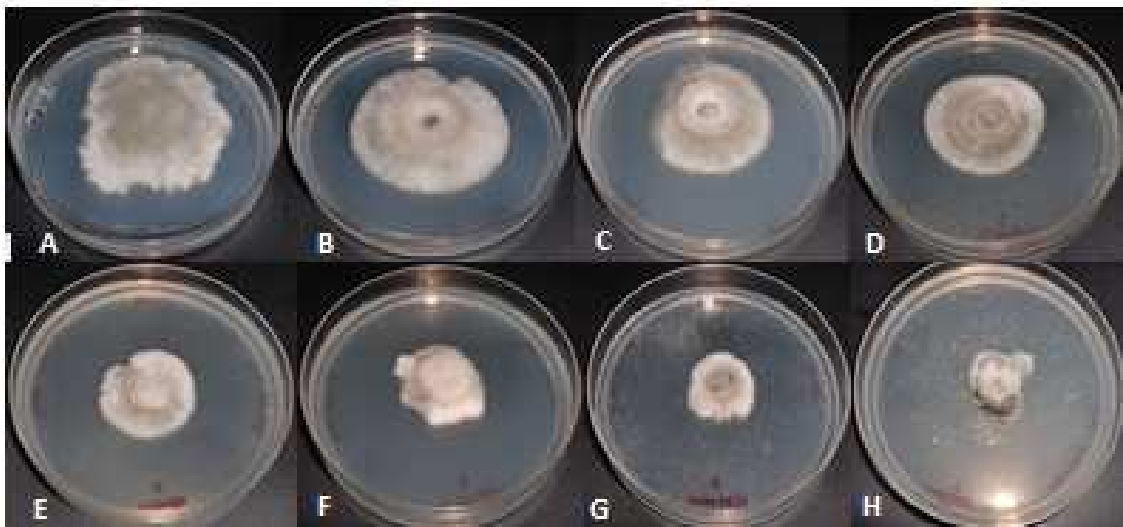
Fecury et al. (2006 a;b), testaram *in vitro* o óleo essencial de *P. aduncum*, contra *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de frutos de coqueiro e observaram uma inibição do crescimento micelial de 67 %. Estudos realizados por Silva (2007) confirmaram que o óleo de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) inibiu parcialmente o crescimento micelial, em todas as concentrações testadas para *F. oxysporum*, *f.sp. cubense* na cultura da banana, resultados estes que corroboram com os encontrados neste estudo.



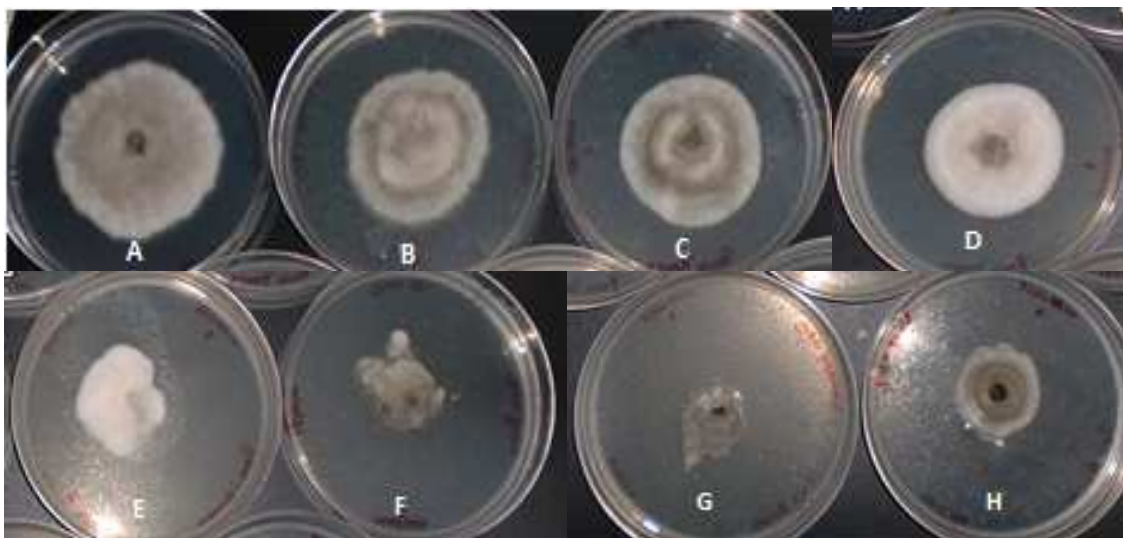
**Figura 18-** Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.



**Figura 19-** Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.



**Figura 20** – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B - 100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

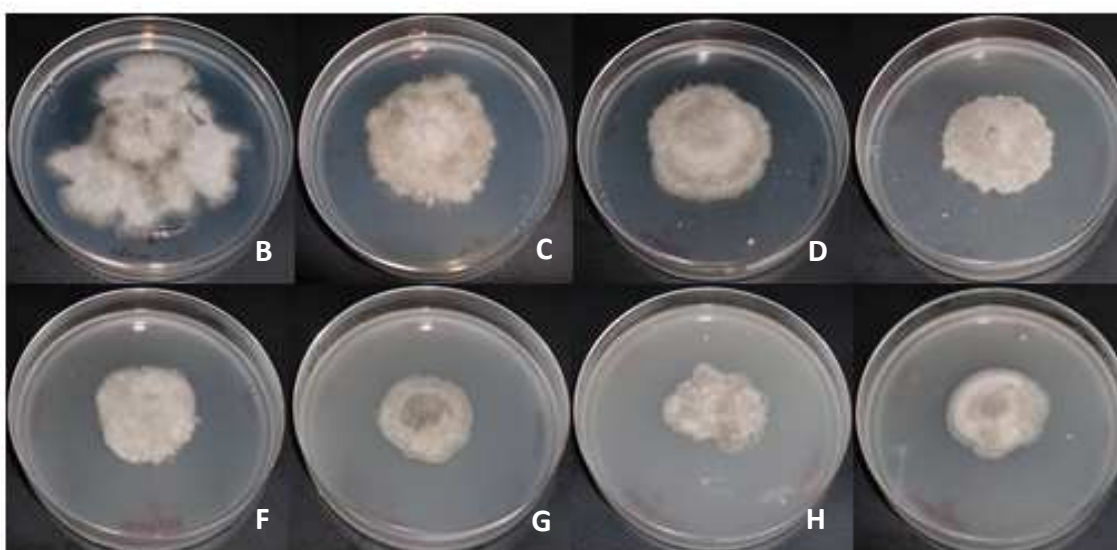


**Figura 21** – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

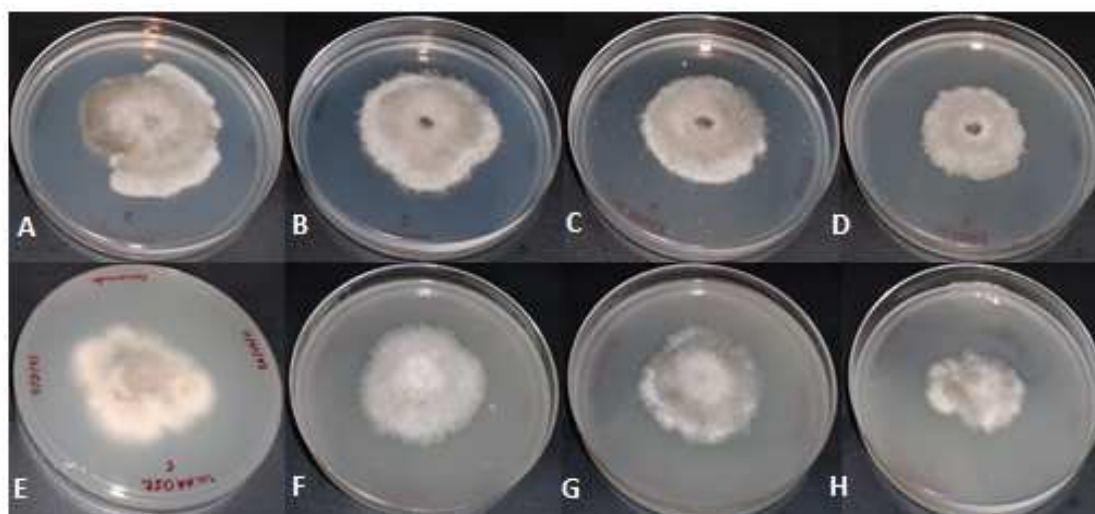
Bastos (1997) demonstrou a ação inibitória *in vitro* do óleo essencial de *P. aduncum* contra *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) e a inibição *in vitro* do crescimento micelial de outros nove fitopatógenos, entre os quais *F.solani* f.sp. *piperis*, agente causal da fusariose da pimenteira-do-reino. Testes *in vitro* com o óleo essencial de *P. aduncum* foram também realizados por Bastos e Benchimol (2006) para o controle em fungos de heliconia (*R. solani*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris incurvata*), de bastão-do-imperador (*Phomopsis* sp., *R. solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp.) e de Angélica (*Polianthes tuberosa* – *Sclerotium rolfsii* e *Colletotrichum capsici*) e observaram inibição total do crescimento micelial de *R. solani*, *S. rolfsii* e *B. incurvata* com 100 µg/mL, de *Phomopsis* sp. e *C. capsici* com 250 µg/mL, de *C. lunata* e *Colletotrichum* sp. com 500 µg/mL e de *F. oxysporum* com 1.500 µg/mL.

O óleo de *P. Aduncum* mostrou-se eficiente no controle de *Colletotrichum musae* em frutos de banana pós-colheita (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004). Garcia et al. (2012) relataram a inibição de aproximadamente 50% do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. Cruz et al. (2012) observaram que o óleo de *Piper aduncum* tem especificidade para o controle das podridões de *Botryosphaeria dothidea* em manga e causou completa inibição do fungo.

O óleo de nim foi o menos eficiente dos óleos testados, porque causou apenas a inibição parcial do crescimento micelial, para todos os isolados (Figuras 22, 23, 24 e 25). Resultados similares também foram encontrados por Venturoso; Bacchi; Gavassoni (2011a), que relataram a inibição do fungo quando submetido ao óleo de nim, no entanto essa inibição não apresentou resultados significativos de controle. Cavalcante (2011) observou que o extrato bruto de folhas de nim reduziu parcialmente o crescimento de *C. truncatum*, em feijão, no entanto não demonstrou ação no controle da antracnose.

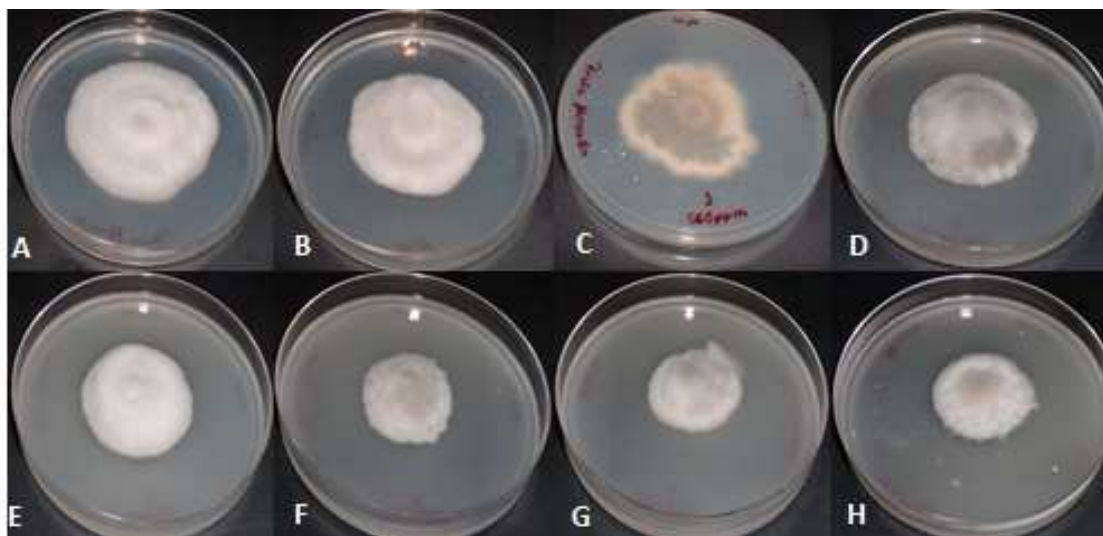


**Figura 22** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

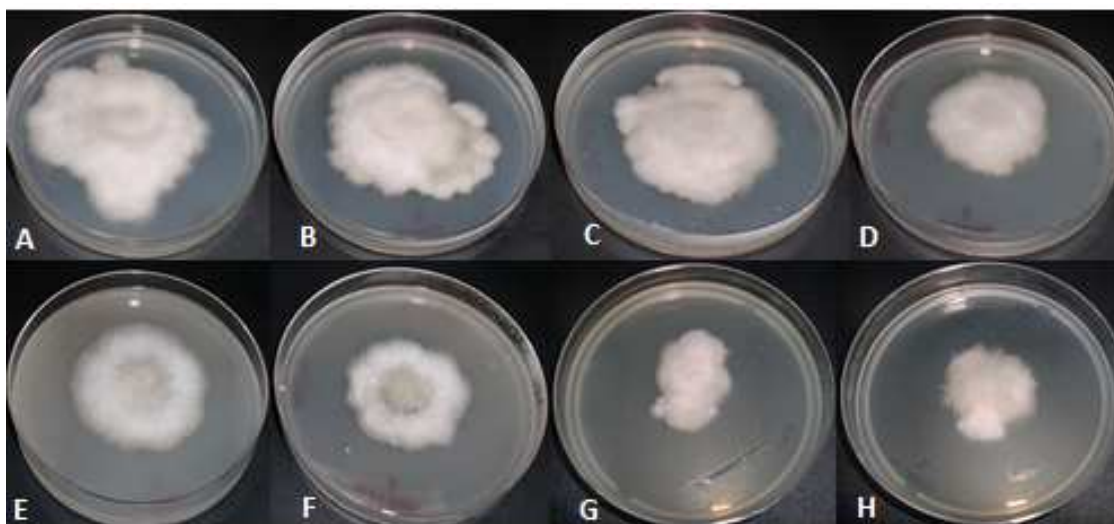


**Figura 23** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.





**Figura 24** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.



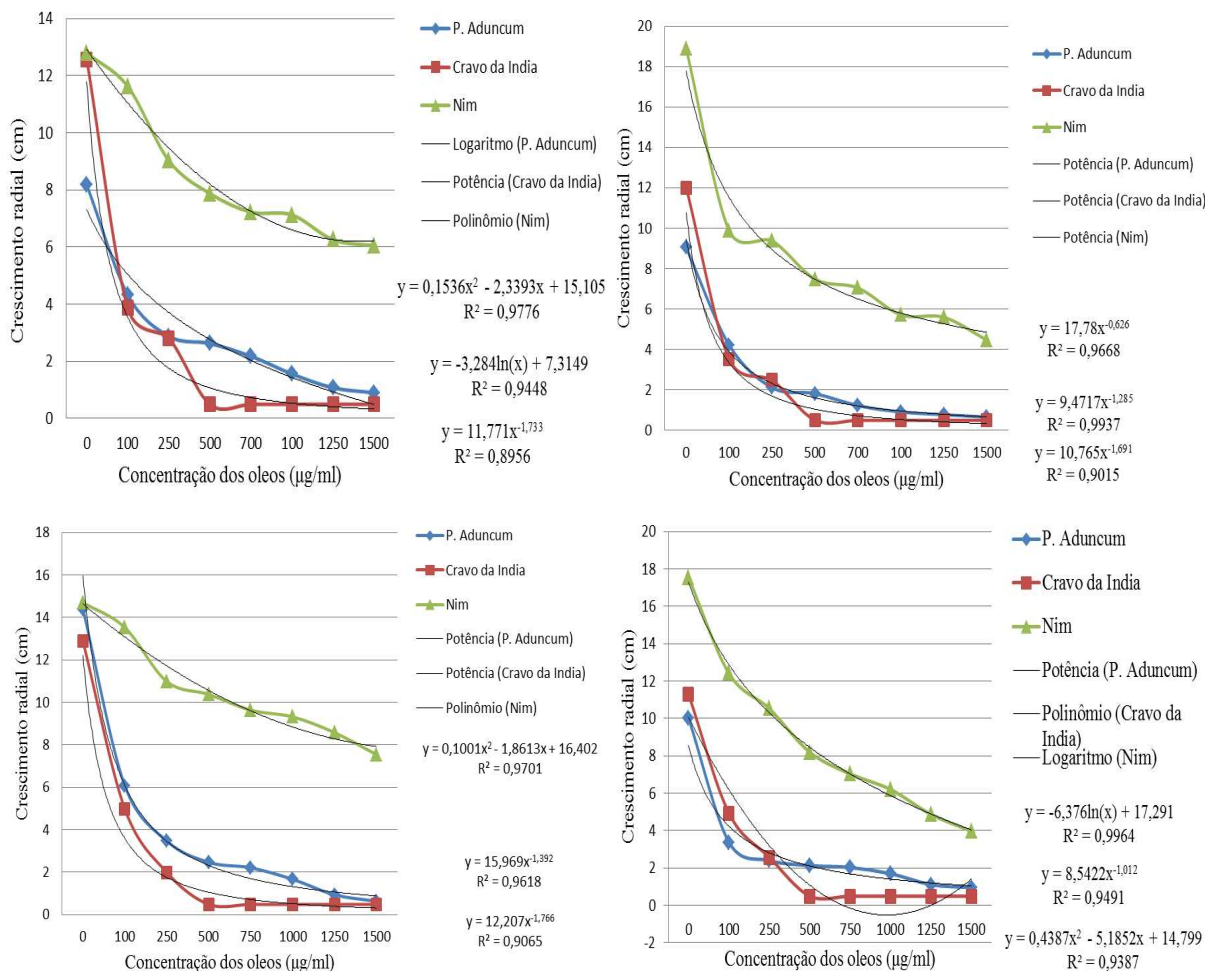
**Figura 25** – Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de nim sob diferentes concentrações. A -Testemunha, B -100 µg/ml, C- 250 µg/ml, D- 500 µg/ml, E- 750 µg/ml, F-1000 µg/ml, G -1250 µg/ml e H- 1500 µg/ml.

Dias-Arieira et al. (2010) verificaram uma redução significativa do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. isolados de fruto de morango com a utilização de óleo de nim. Resultados de Garcia et al. (2012) mostraram que na concentração de 100 µg ml<sup>-1</sup> de nim ocorreu a redução em 53,6% do crescimento micelial em *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. Dados estes condizentes com os encontrados por Sousa; Serra; Melo (2012), que observaram a inibição de *C. gloeosporioides* em pimenta com a utilização do óleo de nim. Solino et al. (2012) demonstraram a inibição parcial do crescimento de *C. gloeosporioides* em maracujá amarelo com óleo de nim.

Foram também realizados testes de inibição dos óleos nas mesmas concentrações citadas anteriormente com diluição do óleo em álcool a 98%. Os melhores resultados foram obtidos com os óleos de cravo-da-índia seguido do óleo de pimenta-de-macaco (Figura 26), os quais causaram uma completa inibição do fungo.

Pode-se observar que com a diluição do óleo de *P. aduncum* em álcool o seu efeito fungitóxico é maior, inibindo 100% do crescimento micelial na concentração de 1500 µg/ml. A diluição do óleo de nim em álcool não apresentou efeito diferencial.

Em relação à diluição dos óleos em álcool, o óleo que apresentou o efeito antifúngico mais pronunciado foi o cravo-da-índia, capaz de inibir completamente o crescimento micelial na concentração a partir de 500 µg/ml em todos os isolados avaliados.



**Figura 26** - Diâmetro da colônia dos isolado A – Camburi, B – Corcovado, C- Praia Almada e D- Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* em doses crescentes de oleos essências de *Piper adundum*, *cravo-da-índia* e nim, submetidos a diluição em álcool etílico a 98%

Os resultados obtidos nos ensaios com álcool, com os isolados demonstraram que todos apresentaram resultados muito similares, mesmo o isolado de Corcovado apresentando um comportamento mais agressivo, seguido do Isolado de praia Brava.

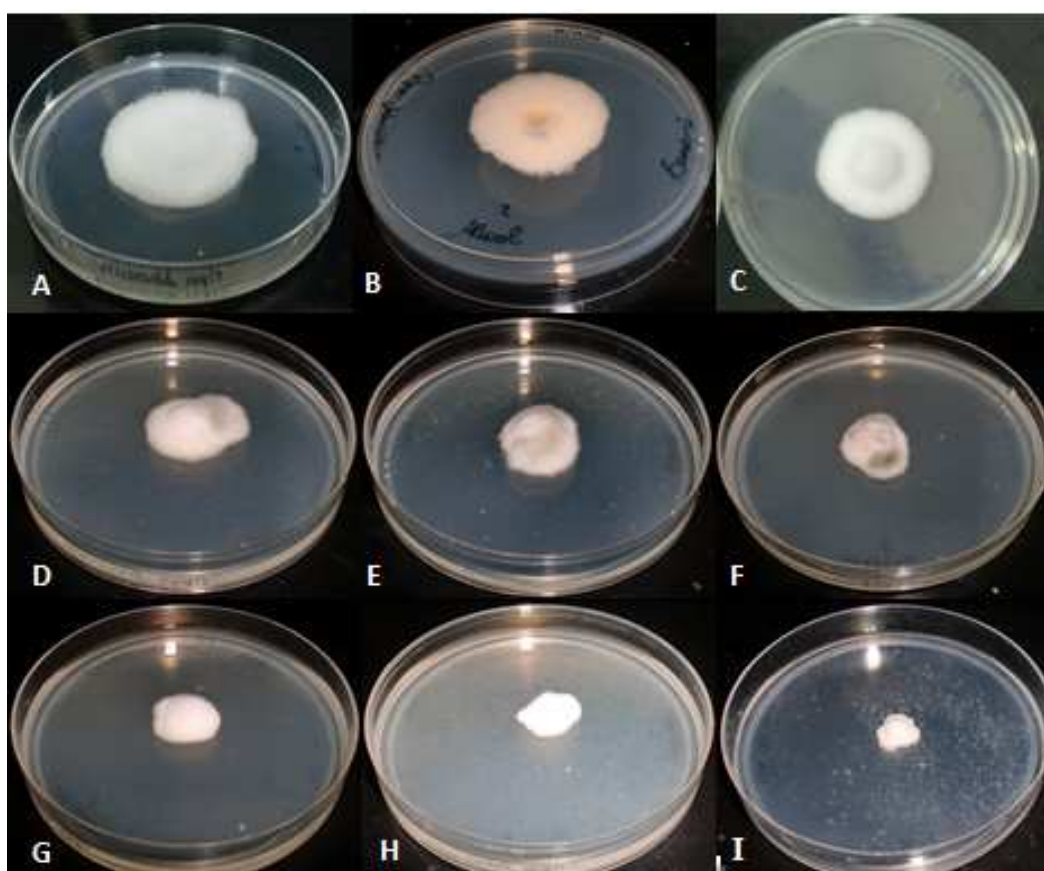
O óleo de nim não demonstrou diferença significativa entre os ensaios com e sem a diluição em álcool, inibindo parcialmente em todas as concentrações, sem no entanto inibir completamente em nenhuma delas.

A diluição em álcool etílico 98% proporcionou uma melhor ação fungitóxica do óleo de pimenta-de-macaco em todos os isolados testados. Os resultados obtidos mostraram efeito inibidor de 95% a 100% do crescimento micelial (Figuras 27, 28, 29 e 30). Podemos perceber com isso a necessidade de um diluidor para o melhor efeito inibidor do óleo de *P. aduncum*

estudos da ação fungitóxica desse óleo demonstram uma maior eficiência do produto quando diluído.

Barbosa et al. (2007) relataram que o óleo de *P. aduncum* tem potencial para utilização no manejo integrado de doenças da manga, uma vez que inibiu o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*, *Dothiorella* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*, principais patógenos pós-colheita de manga.

Na literatura diversos trabalhos como, por exemplo, Estrela et al. (2006) e Sallet et al. (2007), demonstram que o óleo de *P. aduncum* apresenta melhores resultado para o controle de pragas.

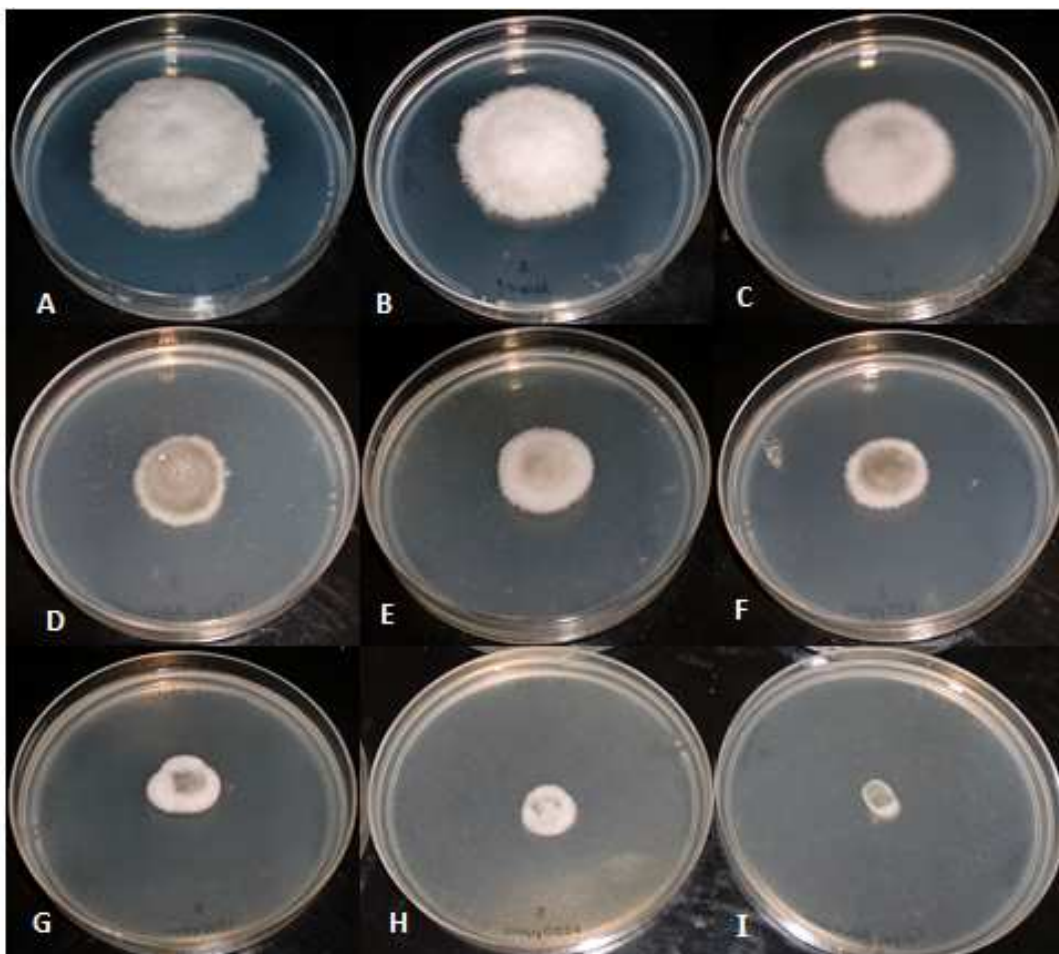


**Figura 27-** Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Camburi, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* com diluição sob diferentes concentrações. A – Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml.

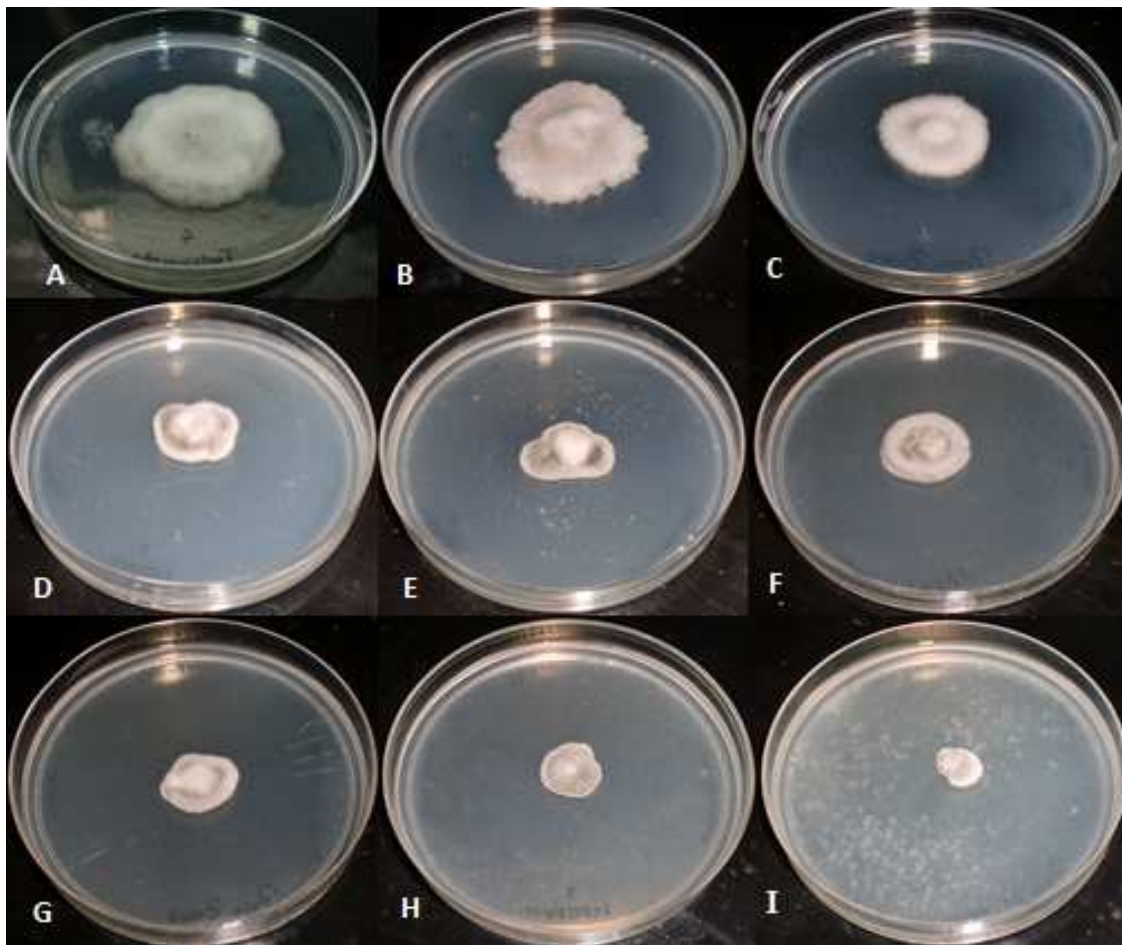


**Figura 28** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Corcovado, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* com diluição sob diferentes concentrações. A – Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml





**Figura 29** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Almada, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* com diluição sob diferentes concentrações. A – Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml



**Figura 30** - Culturas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de frutos de palmeira juçara coletado em Praia Brava, em meio BDA com óleo essencial de *Piper aduncum* com diluição sob diferentes concentrações. A – Testemunha, B – Álcool, C – 100 µg/ml, D – 250 µg/ml, E - 500 µg/ml, F – 750 µg/ml, G – 1000 µg/ml, H – 1250 µg/ml e I – 1500 µg/ml

Quando se avaliou a ação da diluição do óleo de cravo-da-índia, observou-se uma resposta bastante próxima à utilização do mesmo sem nenhum tipo de diluição. Este resultado foi observado em todos os isolados avaliados, demonstrando ser desnecessária esta diluição. Estudos realizados por Rodrigues et al. (2011) demonstraram a inibição total ou parcial do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, evidenciando a existência de compostos biologicamente ativos no óleo de cravo-da-índia.

Os resultados apresentados da ação da diluição do óleo de nim demonstra uma maior ação de inibição, quando comparado ao ensaio sem diluição, contudo não apresentando resultados significantes em relação ao controle do patógeno. Segundo estudos de Almeida; Camargo; Panizzi (2009) para *C. acutatum*, sob ação de diluição foi observado a inibição do crescimento micelial do referido fungo, porém sem efeito de controle. Marques et al. (2003) demonstraram a inibição do fungo *C. gloeosporioides* em mamão, pela ação do óleo de nim diluído em álcool etílico.

Os resultados da produção de conídios, tanto nos ensaios sem diluição como nos ensaios com diluição, obtidos nos isolados de camburi, corcovado e praia almada e praia brava são ilustrados na Figura 31 apresentando resultados muito similares onde em todas as concentrações avaliadas houve inibição parcial, sendo estas correlacionados à dose, ou seja, quanto maior a dose maior a inibição. O melhor óleo avaliado foi o de Cravo-da-índia, Não foi observada a inibição completa dos conídios em nenhum dos óleos testados.

Os isolados de camburi, corcovado e praia almada mostraram diferenças significativas com relação à inibição do número de conídios quando comparados os ensaios com e sem diluição, principalmente com relação à ação do óleo de *P. aduncum*. O isolado praia brava não apresentou diferença significativa entre os ensaios.

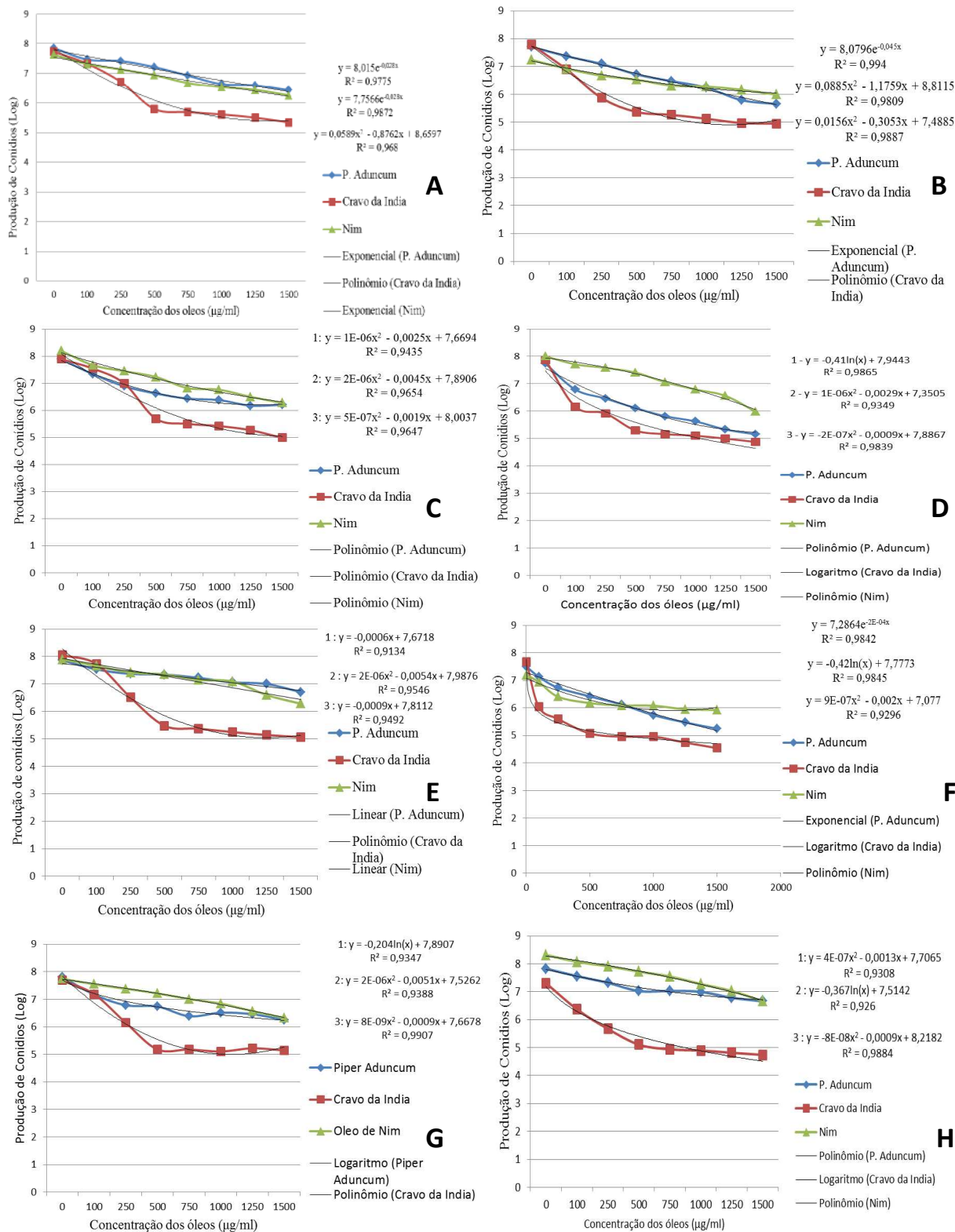


Figura 31- Curva de regressão de produção de conídios dos isolados A e B-Camburi, C e D-Corcovado, E e F-Praia Almada e G e H- Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos à ação dos óleos de *Piper aduncum*, cravo-da-índia e nim nos ensaios sem diluição (coluna da esquerda) e com diluição (coluna da direita).

A Tabela 2 demonstra a média de inibição da produção de conídios comparando-a a dose, nos ensaios com e sem diluição em álcool, para todos os isolados avaliados, onde é possível notar que nem mesmo a maior concentração testada apresentou completa inibição da produção conidial.

**Tabela 2-** Médias da produção de conídios dos isolado Camburi, Corcovado, Praia Almada e Praia Brava de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos a diferentes concentrações dos óleos *Piper aduncum*, cravo-da-índia e nim.

DOSE	Camburi		Corcovado		Praia Almada		Praia Brava	
	Ensaio sem diluição**	Ensaio com diluição**	Ensaio sem diluição**	Ensaio com diluição**	Ensaio sem diluição**	Ensaio com diluição**	Ensaio sem diluição**	Ensaio com diluição**
<b>Testemunha 0 (Pura)</b>	7,7348A	7,5740A	7,9942A	7,8697A	7,9372A	7,4585A	7,7421 A	7,8161A
<b>Testemunha Álcool</b>	-	7,4690B	-	7,8183A	-	7,3991A	-	7,6766B
<b>100 µg/ml</b>	7,3686B	7,0621C	7,5172B	6,8838B	7,6414B	6,7010B	7,2977 B	7,3350C
<b>250 µg/ml</b>	7,0884C	6,5444D	7,1093C	6,6522C	7,0975C	6,2460C	6,7671 C	6,9682D
<b>500 µg/ml</b>	6,6511D	6,2008E	6,5140D	6,2720D	6,7239D	5,8892D	6,3736 D	6,6169E
<b>750 µg/ml</b>	6,4324E	6,0167F	6,3540E	6,0081E	6,5811E	5,7233E	6,1883 E	6,5032F
<b>1000 µg/ml</b>	6,2659F	5,8793G	6,2533E	5,8404F	6,4669F	5,5920F	6,1516 E	6,3890G
<b>1250 µg/ml</b>	6,1853F	5,6420H	5,9788F	5,6271G	6,2460G	5,5705G	6,0819 F	6,2086H
<b>1500 µg/ml</b>	6,0151G	5,5295I	5,8204G	5,3363H	6,0183H	5,3879H	5,9041 G	6,0209I
<b>C.V</b>	2,206	0,882	2,327	1,628	1,352	1,794	1,049	1,528

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

\*\* Médias das diferentes doses dos três óleos testados. Dados transformados em logaritmo na base 10

Ao correlacionarmos a dose com os isolados foi observado que praticamente todas as concentrações submetidas a cada isolado avaliado apresentou diferença significativa entre si. Os quatro isolados, quando avaliados entre si, demonstram que não houve diferença significativa entre si no ensaio sem diluição em álcool.

Os isolados Camburi, Corcovado e Praia Almada quando submetido aos óleos com diluição em álcool apresentaram uma maior inibição da produção de conídios. O isolado Praia Brava foi o único que apresentou uma menor quantidade de inibição da produção de conídios quando comparado com o ensaio com álcool

Os isolados Camburi e Praia Almada apresentaram todas as doses estatisticamente diferentes.

No isolado Corcovado e Praia Brava foi observado que entre as concentrações de 750 µg/ml e 1000 µg/ml no ensaio sem diluição não houve diferença significativa entre os resultados.

É possível observar que a Testemunha com álcool apresentou diferença significativa, quando comparada a testemunha pura nos isolados de Camburi e Praia Brava. Os isolados de Corcovado e Praia Almada não apresentaram resultados estatisticamente diferentes quando comparados à testemunha pura.

Quando se avaliou o número de conídios, observou-se que ocorre uma diminuição significativa em todas as concentrações dos óleos testados para todos os isolados. Pinto et al. (2009) observaram a ação de germinação em *Colletotrichum lindemuthianum*, do óleo de cravo-da-índia, o qual inibiu completamente a germinação em todas as concentrações observadas.

Segundo Cavalcante (2011), o extrato de nim não inibiu a esporulação de *C. truncatum*. Carvalho (2010) constatou a inibição parcial da esporulação de *C. gloeosporioides* do cajueiro com o extrato de nim nas concentrações de 5% e 10%.

Almeida; Camargo; Panizzi (2009) relataram a inibição da produção dos conídios de *C. acutatum* na cultura do morango com a utilização de óleo de nim. Estudos realizados por Delespaul; Billerbeck, (2000) mostraram a inibição da germinação de *Colletotrichum ssp*, contudo, não de forma significativa. Estes resultados também foram encontrados neste estudo. Hanada; Gasparotto; Pereira (2004), estudando o efeito biológico do óleo essencial de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* observaram uma inibição parcial da germinação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, atribuindo a esta a presença do safrol no óleo essencial.

É importante ressaltar, contudo, que os óleos essenciais apresentam algumas limitações, como a baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos produtos durante sua manipulação (SILVA et al., 2005). Por conta disso observa-se a necessidade de maiores estudos para a descoberta das melhores formas de manejo tanto para óleos essenciais como também para extratos brutos.

Segundo Menezes et al. (2009), alguns fatores importantes devem ser levados em conta, como a técnica utilizada, o meio de crescimento, o micro-organismo, a técnica de extração e as variações genéticas de uma mesma espécie vegetal que podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo.

## 5 – Conclusão

O resultado mais significativo foi encontrado com o óleo de cravo-da-índia, que demonstrou uma inibição total do crescimento micelial na concentração de 250 µg/ml em todos os ensaios. Este resultado pode indicar uma possível alternativa no controle biológico para este patógeno.

Quando submetido à diluição com álcool etílico a 98%, o óleo de cravo-da-índia permaneceu sendo o mais eficaz. Os resultados obtidos mostraram que o segundo melhor óleo foi o de *Piper aduncum* que apresentou completa inibição a partir da concentração de 1250 µg/ml. Contudo este resultado apresenta-se muito elevado para utilização

O óleo de nim apresentou inibição em todos os isolados testados, contudo, sem inibição total em nenhuma das concentrações avaliadas.

Os resultados da produção de conídios mostraram que todos os óleos avaliados não apresentaram diferença significativa entre si. Houve inibição parcial do número de conídios.

## 6 – Conclusões Gerais

Os testes de PCR demonstraram que a antracnose da palmeira juçara faz parte do Complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, no entanto são necessários outros estudos a fim de se descobrir a espécie causadora da antracnose na juçara, sendo necessário para isso, sequenciar e confrontar os resultados com dados de morfologia comprobatória.

Todos os isolados apresentaram a temperatura de 28° como a ideal para crescimento micelial, produção e germinação de conídios.

Todos os óleos testados promoveram inibição do crescimento micelial de todos os isolados.

O óleo de cravo da índia foi o mais eficiente promovendo redução de 100% a partir de 250 µg/ml de concentração.

Com relação à produção de conídios os óleos proporcionaram uma redução na produção, contudo, sem inibir completamente esta produção.

## 7 – Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, T.F., CAMARGO, M., PANIZZI, R.C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009
- AMADIOHA, AC. 2000. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts *Azadirachta indica*. **Crop Protection, Oxford**, v.19, n.5, p.287-290.
- BAILEY, J. A et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CAB International. 1992. pp.88-120.
- BARBOSA, A.G. et al. Ação dos extratos de *Piper aduncum* e *Cymbopogon citratus* sobre o crescimento micelial de fungos pós-colheita de manga. **Fitopatologia Brasileira** v. 32 (Suplemento), agosto p S150, 2007
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.
- BASTOS, C. N. Fungitoxidade *in vitro* e ação protetora e curativa de óleos essenciais contra *Clinipellis pernicioso* **Revista de Ciências Agrárias**, n. 47 – jan/jun 2007 – Belem: UFRA, 2007
- BASTOS, C. N. Óleos essenciais e plantas: uma alternativa de controle de fitopatógenos. Pragas e doenças de cultivos amazônicos, 2ª Edição, Belém-PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 379p, Capítulo 5, 2008.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.
- BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection, Oxford**, v. 22, p. 1087-1092, 2003.
- BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica** 25:90-92.1999.
- BENCHIMOL, R. L. Utilização de substâncias naturais para o controle de doenças de plantas na região amazônica / Ruth Linda Benchimol, Carina Melo da Silva, Jaqueline Rosemeire Verzignassi. – Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2008. 27p. : il. ; 21cm. - (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos 346
- BETTIOL, W (Ed). Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna **EMBRAPA-CNPDA, (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15)**, 388p, 1991.
- BIZI, R. M. Alternativas de controle do mofo-cinzento e do oídio em mudas de eucalipto. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- BOWERS, J. H.; LOCKE, J. C. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of Fusarium wilt in the greenhouse. **Plant Disease, St. Paul**, v. 84, n. 3, p. 300-305, 2000.
- BUFFON, R. B. et al. Efeito de extratos de cravo da índia e pimenta malagueta no controle “in vitro” do *Colletotrichum gloeosporioides*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE



INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 10. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2010.

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

CARNEIRO, S. M. de T. P. G. Efeito do Nim (*Azadirachta indica*) sobre Oídio e Antracnose, INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - LONDRINA-PR, **Informe da Pesquisa nº 155**, Agosto 2008.

CARVALHO, P. R. S. Extratos vegetais: potencial elicitor de fitoalexinas e atividade antifúngica em antracnose do cajueiro. 2010. 64f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista.

CASTRO, R.A. et al. Atividade fungitóxica do óleo fixo e de extratos de mamona em *Colletotrichum lindemuthianum*. In: **2º Congresso Brasileiro de mamona**, 2006, Aracajú. **Resumos...** Aracajú: Embrapa, 2006.

CAVALCANTE, G. R. DOS S. Reação de subamostra de feijão-fava à antracnose e seu controle com extrato de nim 62 F. : il., Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. de. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.12, p. 234-235. 1987.

CIMANGA, K. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p.382-387, September/October, 2002.

COSTA, C. L. da Efeitos do óleo de Nim [*Azadirachta indica* A. Juss (*Meliaceae*) sobre crescimento, esporulação, viabilidade de esporos, morfologia e produção de aflatoxinas B1 e B2 em *Aspergillus flavus* Tese (Doutorado) – Ciências Biológicas da Universidade estadual de Maringá – Maringá, 2009.

COSTA, R. C. et al. Sensibilidade *in vitro* de óleos essenciais no controle de *Corynespora cassiicola*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

CRUZ, M. de M. et al. EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS SOBRE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM MANGA, CV. KENT, **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 1-6, mar.-jun., 2012

DELESPAUL, Q., BILLERBECK, V.G., et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.256-266. 2000.

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

DUARTE M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Dublin, v. 97, n. 3, p. 305-311, 2005.

ESTRELA, J.L.V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa. agropecuária. Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.217-222, fev. 2006

FAZOLIN, M. et al. Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): Características gerais e resultados de pesquisa, Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 56p (Embrapa Acre. Documentos, 103), 2006.

FECURY, M. M. et al. Controle da antracnose do coco através do uso de óleos essenciais em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém, PA. **Resumos...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006a. p. 20.

FECURY, M. M. et al. Efeito de óleos essenciais no crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. agente causal da antracnose do côco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006b. p. 41.

FEITOSA, F. M.; CARVALHO, P. R. S.; CARVALHO, E. M. S. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em cajueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32 (Suplemento), Maringá, p. S16.2, 2007.

FERRÃO, J. E. M. **Especiarias: cultura, tecnologia e comércio**. Lisboa: Ministério do Planejamento e da Administração do Território/Secretária de Estado da Ciência e Tecnologia/ Instituto de Investigação Científica Tropical, 1993, 443p.

GALLI, F. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: editora Agronômica Ceres, vol.2, 1978.

GARCIA, R. A. et al. Antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum* **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57, Jan./Feb. 2012

GOLTTLIEB, O. R. et al. Óleos essenciais na Amazônia VII. **Acta amazônica**, Manaus, v. 11, p. 143-148, 1981.

GUIMARAES, G. R.; PAZ-LIMA, M. L. MORFOMETRIA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. I Jornada de Iniciação científica, artística e Cultural do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, **Anais** 2010 p 42 - 44

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. 2004. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. **Fitopatologia Brasileira**, 29(1): 94 - 96.

LIMA, M.I.P.M., GASPOROTO, L. & SANTOS, A. Controle químico da antracnose do maracujazeiro. Manaus. EMBRAPAMARA. Comunicado técnico 05, 1993.

LIMA, N. B. et al. Efeito fungitóxico de produtos naturais sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro. 2010

LOBATO, A. K. da S. et al. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 915-917, 2007.

MAGALHAES, F. H. L; ARAUJO, E.; COUTINHO, W. M. Efeito dos óleos essenciais de pequi (*Cariocar brasiliensis*) e de dendê (*Elaeis guineensis*) e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a microflora de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 369-370, 1996. Suplemento.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon region. **Flavour of the Fragrance Journal**, Chichester, v. 13, p. 269-272, 1998. In: BASTOS, C. N. Óleos essenciais e plantas: uma alternativa de controle de fitopatógenos. Pragas

e doenças de cultivos amazônicos, 2ª Edição, Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 379p, Capítulo 5, 2008.

MARQUES, S. S. et al. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos do mamoeiro **Revista Papaya Brasil**, p 591-593, 2003.

MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142p.

MARTINS, R. M.; CORTEZ, L.E. R.; FELIPE, D. F. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo-da-índia **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 259-263, set./dez. 2008.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico de cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

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

MELO, R. M. C. de A. et al. Inibição do crescimento micelial de isolados de *colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* com uso de óleo de cravo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 1088-1093.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia** da UNESP, 38, 184-191, 2009.

MONTES-BELMONT, R et al. Propiedades antifúngicas en plantas superiores - análisis retrospectivo de investigaciones. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Sonora, v. 18, n. 2, p. 125-131, 2000. In: ALVES, K. F. Controle alternativo da antracnose do pimentão com extratos vegetais. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- PE, 2008.

MORAIS L. A. S. et al. Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. **Horticultura Brasileira**, v.27, n. 2, p.S113-S117, Agosto 2009.

NEVES, B. P. da; OLIVEIRA, I. P. de; MOHN, J. C. **Cultivo e utilização do nim indiano.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003, 12 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 62).

PANDEY, V. N.; DUBEY, N. K. Antifungal potential of leaves and essential oils from higher plants against soil phytopathogens. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, n.10, p.1417-1421, 1994. In: Benchimol, Ruth Linda, Utilização de substâncias naturais para o controle de doenças de plantas na região amazônica / Ruth Linda Benchimol, Carina Melo da Silva, Jaqueline Rosemeire Verzignassi. – Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 27p. : il. ; 21cm. - (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 346)

PERES, N.A.R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.128-134, 2002.

PIERRE, R. O. Óleo essencial e extrato de cravo-da-índia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em sementes e mudas de café, Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

PINTO, C. E. M. et al. POTENCIAL FUNGITÓXICO DE *Syzygium aromaticum* SOBRE OS ESPOROS DE *Colletotrichum lindemuthianum*, IV Congresso de Pesquisa e inovação da Rede Norte e Nordeste de educação e tecnologia, Belem – Pa - 2009

PINTO, F.A.M. et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de mangueira. *Tropical Plant Pathology*. Lavras, MG, v. 40, n. 12, p. 213- 220, 2010.

PRABAKAR, K. et al. Effect of plant products on the mycelial growth and conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango fruits. *Madras Agricultural Journal*, Madras, v. 90, n. 10-12, p. 707-710, 2003.

PUPO, M.S. et al. Antifungal activity of monoterpenes against the plant pathogens *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas*. *Applied and Environmental Microbiology* submitted, 2003.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1267-1271, 1999.

RODRIGUES, M.S. et al. Efeito do óleo essencial e do hidrolato de *Eugenia caryophyllata* Thunb. no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em manga. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR (VIII EPCC). Anais Eletrônico...CESUMAR ( Centro Universitário de Maringá), 2011

ROZWALKA, L. C. **Controle alternativo em frutos de antracnose em frutos de goiabeira**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

ROZWALKA, L.C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SALLET, L. A. P. et al Atividade inseticida do extrato etanólico de *Momordica charantia* L. sobre a broca-de-café *Hypothenemus hampei* (FERRARI) (Coleoptera: Scolytidae) SPCB (5. : 2007 : Águas de Lindóia, SP) - Resumos Expandidos 2007. Disponível em <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/10> Acesso em julho 2012

SANTOS, L. G. M. dos et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p. 11-14, jan./dez. 2007. Disponível em <http://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica> Data: maio de 2012.

SBRAGIA, R. J. Chemical control of plant diseases, an exciting future. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p. 257-267, 1975.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: PASCHOLATI, S. F (Cord.). REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., São Pedro, SP, 2002. **Resumos ...** Piracicaba: FEALQ, 2002. p.27-28.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.;SUZUKI, C. C. L. F.; ITAKO, A. T. Utilização de extratos vegetais no controle de doenças de Plantas, Métodos Alternativos de controle de insetos-praga,

doenças e plantas daninhas: Panorama atual e Perspectivas na agricultura, Belém – PA: Embrapa Amazônia Oriental, 305p., Capítulo 6, p.131-152, 2008.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, J. C. da. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal-do-Panamá da bananeira**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas – Rio Largo, 65 f.: il. Tabs., grafs 2007.

SILVA, J. L. da et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde** (Mossoró – RN) v.7, n.1, p. 80 – 86, 2012 Disponível em: <http://revista.gvaa.com.br>.

SILVA, K.J.D. Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum linde muthianum* no Brasil. Dissertação, UFLA, 88p., 2004.

SILVA, M. B. et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JR., T. J.; PALLINI, A (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 221-246.

SILVA, M. H. L. Tecnologias para o desenvolvimento agroindustrial de Piper aduncum L. 2004. 78f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SOLINO, A. J da S. et al. Severidade da antracnose e qualidade dos frutos de maracujá-amarelo tratados com produtos naturais em pós-colheita. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 1, p. 057-066, Março 2012.

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

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V (eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 45-62.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.11, p.16-21, 1999.

TERAO, D. Embrapa estuda estratégias de controle alternativo de doenças na pós-colheita de frutas evitando resíduos químicos: Embrapa Meio Ambiente, 2012. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=72621>, Acesso em: maio 2012

VENTUROSOSO, L.R. et al. Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.89-95, jan./mar., 2011b.

VENTUROSOSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.18-23, 2011a.

WACULICZ-ANDRADE, C. E. **Variabilidade genética de fungos do gênero Colletotrichum de plantas cítricas e da vegetação espontânea**. 79p. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2009.

YUKAWA, T.A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. *Antiviral Research* 32:63-70, 1996. In: MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico de cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.