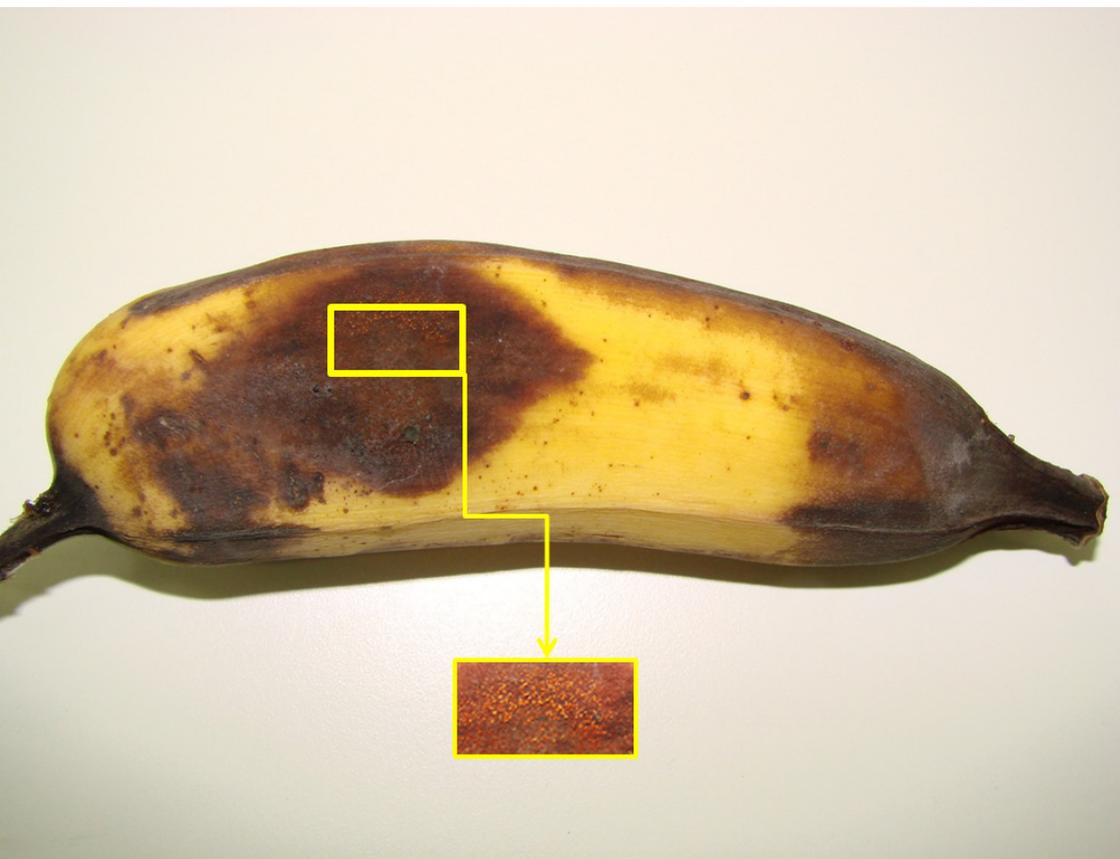


**Inibição In Vitro de *Colletotrichum Musae*,  
Agente da Antracnose da Banana, por  
Meio de Agentes Vegetais, Biológicos e  
Químicos**



ISSN 1679-6543

Agosto, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 57***

**Inibição In Vitro de *Colletotrichum  
Musae*, Agente da Antracnose  
da Banana, por Meio de Agentes  
Vegetais, Biológicos e Químicos**

*Francisco Marto Pinto Viana  
Erivanda Silva de Oliveira  
Maria Nenmaura Gomes Pessoa  
Marlon Vagner Valentim Martins*

Embrapa  
Brasília, DF  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição**

Embrapa Agroindústria Tropical  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
Home page: [www.cnpat.embrapa.br](http://www.cnpat.embrapa.br)  
E-mail: [vendas@cnpat.embrapa.br](mailto:vendas@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*  
Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*  
Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues  
Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa  
Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda*

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*  
Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*  
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*  
Foto da capa: *Francisco Marto Pinto Viana*

1ª edição (2012): versão eletrônica

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Agroindústria Tropical**

---

Inibição in vitro de *Colletotrichum musae*, agente da antracnose da banana, por meio de agentes vegetais, biológicos e químicos / Francisco Marto Pinto Viana... [et al.] – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

30 p.; 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543, 57).

1. *Musa* spp. 2. Desinfecção química. 3. Antagonismo in vitro.  
I. Viana, Francisco Marto Pinto. II. Oliveira, Erivanda Silva de.  
III. Pessoa, Maria Nenmaura Gomes. IV. Martins, Marlon Vagner Valentim. I. Série.

---

CDD 634.772

© Embrapa 2012

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	7
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	12
Resultados e Discussão .....	16
Conclusões.....	25
Referências .....	26

# Inibição In Vitro de *Colletotrichum Musae*, Agente da Antracnose da Banana, por Meio de Agentes Vegetais, Biológicos e Químicos

---

*Francisco Marto Pinto Viana*<sup>1</sup>

*Erivanda Silva de Oliveira*<sup>2</sup>

*Maria Nenmaura Gomes Pessoa*<sup>3</sup>

*Marlon Vagner Valentim Martins*<sup>4</sup>

## Resumo

A antracnose (*Colletotrichum musae*) destaca-se entre as doenças que afetam a banana. Com objetivo de controlar esse patógeno, avaliou-se, em ensaio in vitro, a eficiência dos extratos e óleos essenciais de: *Lippia sidoides* Cham., *Caryophyllus aromaticus* L. e *Eucalyptus citriodora* Hook.; antagonistas, como o fungo *Trichoderma* sp., a levedura IA8 (UFC), e *Bacillus subtilis*; indutores de resistência, como o acibenzolar-S-metil, o fosfito de potássio e o ácido salicílico; e, ainda, antissépticos, como o hipoclorito de sódio (NaClO), o dióxido de cloro e o sorbato de potássio. Os testes in vitro foram feitos em meio BDA + tetraciclina (50 µg.mL<sup>-1</sup>), nas concentrações de 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL e 30 mL de cada extrato; 0 µL, 25 µL, 50 µL e 100 µL de cada óleo; 0,05 g, 0,3 g e 300 µL dos indutores Bion®, ácido salicílico e fosfito de potássio, respectivamente; 0,1 g, 25 mL e 100 µL dos antissépticos sorbato de potássio, hipoclorito de sódio e dióxido de

---

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, D. Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, marto.viana@embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Fitotecnia, professora substituta de Fitopatologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, erivandadeoliveira@hotmail.com

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, professora-adjunta de Fitopatologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, nenmaura@ufc.br

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, marlon.valentim@embrapa.br

cloro, respectivamente, sendo a atividade antagonica determinada pelo método de culturas pareadas para *Trichoderma* sp. e pelo método do funil para a levedura IA8. A formulação com *Bacillus subtilis* foi testada na proporção de 100 µL/100 mL de BDA. Placas com apenas meio BDA ou o fungicida carbendazim (10 µL/100 mL) foram utilizadas como testemunhas. Os testes foram realizados à temperatura de 28 °C ± 2 °C e com fotoperíodo de 12h durante um período de sete dias. Em todos os casos estudados, os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em todas as concentrações testadas, os extratos e óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Caryophyllus aromaticus*, assim como o ácido salicílico, o hipoclorito de sódio e o controle químico, foram efetivos, inibindo o patógeno. O fosfito de potássio e os antagonistas *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* também foram efetivos com reduções de 91,8%; 84,0% e 74,0%, respectivamente. Conclui-se que os extratos e óleos essenciais vegetais de *Lippia sidoides* e *Caryophyllus aromaticus*, o ácido salicílico, o hipoclorito de sódio, fosfito e os antagonistas *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* poderão constituir-se em alternativa promissora ao controle do *Colletotrichum musae*.

Termos para indexação: *Musa* spp., desinfecção química, antagonismo in vitro.

# In Vitro Inhibition of *Colletotrichum musae*, Agent of Banana Anthracnose, by Vegetal, Biological and Chemical Agents

---

## Abstract

Anthracnose (*Colletotrichum musae*) stands out among the diseases that affect bananas. In order to control this pathogen, a assay in vitro was evaluated to test the efficiency of extracts and essential oils of: *Lippia sidoides* Cham., *Caryophyllus aromaticus* L. and *Eucalyptus citriodora* Hook.; some antagonists, such as *Trichoderma* sp., yeast IA8 (UFC), and *Bacillus subtilis*; resistance elicitors, such as acibenzolar-S-methyl, potassium phosphite and salicylic acid, and also antiseptic products, such as sodium hypochlorite (NaClO), chlorine dioxide and potassium sorbate. In vitro tests were made in PDA + tetracycline element ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), at concentrations of 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL each extract; 0  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  and 100  $\mu\text{L}$  each oil; 0,05 g, 0,3 g and 300  $\mu\text{L}$  of Bion® inductors, salicylic acid and potassium phosphite, respectively; 0,1 g, 25 mL and 100  $\mu\text{L}$  of each antiseptic – potassium sorbate, sodium hypochlorite and  $\text{ClO}_2$ , respectively. The antagonistic activity was conducted using the dual cultures method for *Trichoderma* sp. and the glass funnel method for the yeast IA8, both cultivated on Petri dishes containing PDA. *Bacillus subtilis* formulation was tested at 100  $\mu\text{L}$ /100 mL of PDA. Petri dishes containing only PDA or the fungicide carbendazim (100 ppm of active ingredient) were used as controls. The tests were performed at 28 °C

± 2 °C temperature and with photoperiod of 12h for a period of seven days. In all studied cases, treatments were distributed in randomized design with five repetitions each. The averages were compared by Tukey test ( $P \geq 0,05$ ). Results obtained showed that the extracts and essential oils of *Lippia sidoides* and *Caryophyllus aromaticus*, in all tested concentrations, as well as the salicylic acid and the sodium hypochlorite as the chemical control were effective, inhibiting the pathogen. Potassium phosphite and the antagonists *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* also demonstrated effectiveness with reductions of 91,8%; 84,0% and 74,0%, respectively. It is concluded that plant extracts and essential oils of *Lippia sidoides* and *Caryophyllus aromaticus*, salicylic acid, sodium hypochlorite, phosphite and the antagonists *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* might constitute a promising alternative to the control of *Colletotrichum musae*.

Index terms: *Musa* spp., chemical disinfection, antagonism in vitro.

## Introdução

A banana (*Musa* spp.) está entre as frutas mais consumidas, sendo explorada na maioria dos países tropicais. Atualmente, o Brasil se destaca como quinto produtor mundial da fruta, com a produção de 6.978.310 t/ano (FAOSTAT, 2010). É uma fruta consumida quase sempre na forma in natura, o que faz dela parte integrante da alimentação da população de baixa renda, não só pelo seu alto valor nutritivo, como também por seu custo relativamente baixo.

Apesar da sua importância agroalimentar, a banana, como a maioria das culturas que ocupam grandes áreas, está sujeita a vários problemas fitossanitários, dentre os quais se destaca a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum musae* (Berk. e Curtis) Arx., que ocorre na pós-colheita, com ampla distribuição geográfica (VENTURA; HINZ, 2002). Economicamente, o patógeno é muito importante porque, além de causar prejuízos em pós-colheita, também causa danos no campo e é um fator limitante da qualidade, prejudicando a comercialização dos frutos, principalmente quando esses se destinam à exportação (COUTO; MENEZES, 2004). Os frutos infectados pelo fungo têm o seu amadurecimento acelerado e, mesmo que a polpa não seja atingida, o fruto torna-se de aspecto indesejável para o consumo, inviabilizando a exportação (DEL PONTE, 2009).

Na pós-colheita, as medidas de controle são constituídas principalmente de fungicidas. Atualmente, tem despertado a procura por produtos naturais, como biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais, no controle de doenças de plantas, para evitar danos ao homem e ao ambiente causados pelos produtos químicos, que geram fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e resistência do patógeno (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

O uso de métodos alternativos para o controle de doenças e pragas tornou-se estratégia, visando causar menores danos ao ambiente e à saúde humana. Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado

o potencial dessas substâncias no controle de fitopatógenos (CUNICO et al., 2006). Produtos do metabolismo primário e secundário dessas plantas (alcaloides, flavonoides, taninos, óleos essenciais e heterosídeos) são biologicamente ativos e têm ação fungicida, inseticida, citotóxica, antiviral, tranquilizante, analgésica, entre outras (CARDOSO et al., 2001; ROZWALKA et al., 2008).

O controle biológico de doenças pós-colheita tem mostrado bons resultados (VALDEBENITO-SANHUEZA; CATTANIO, 2001). A diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagonicas, surge como ferramentas importantes para o controle biológico aplicado. No que se refere a antagonistas bacterianos, há prevalência dos gêneros *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* e *Streptomyces*, representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008). Em especial, o *Bacillus* spp. se destaca por formar endósporos e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagonicos. Também a produção de antibióticos é característica de algumas leveduras que têm se mostrado efetivas no controle in vitro e in vivo (BETTIOL, 2009). O potencial antagonico das leveduras foi verificado pela primeira vez nos anos 1980, apresentando redução do crescimento e esporulação de alguns fitopatógenos (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A indução de resistência em plantas a patógenos é conhecida desde meados do século 20 e, atualmente, já é percebida a imensa possibilidade do emprego de indutores no controle das doenças de plantas (MARIANO; ROMEIRO; 2000). Muitas substâncias químicas são capazes de provocar reações de defesa das plantas, como o ácido jasmônico, o ácido salicílico, os salicilatos e os análogos, os silicatos, o fosfito de potássio, a quitosana (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005). Existe sucesso relativo com o emprego de indutores de resistência no controle de doenças pós-colheita. Trabalhos realizados mencionam o uso de Bion® em diferentes plantas para o controle de alguns patógenos (SILVA; RESENDE, 2001; PEREZ, 2002; QUERINO et al., 2005), como *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão (DANTAS, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008)

e no controle da mancha-aquosa em melão, ocasionada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Outras técnicas têm sido desenvolvidas buscando-se alternativas para o controle de doenças em pós-colheita de frutos. O cloro, por exemplo, na forma de hipoclorito, é um agente de controle utilizado como desinfestante e é reconhecido como um sanitizante seguro, estável e não corrosivo (MARI et al., 1999; TERAO et. al., 2007). Alternativas para o uso do hipoclorito vêm sendo estudadas, entre as quais, o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). Vários patógenos em pós-colheita têm sido controlados pelo dióxido de carbono, tais como *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* e *Penicillium expansum* (SPOTTS; PETERS, 1980). Os trabalhos desenvolvidos por Terao et al. (2007) concluíram que o ClO<sub>2</sub>, associado à refrigeração, pode contribuir de maneira eficiente no controle integrado de doenças pós-colheita de melão.

Outro produto já de uso comum no trato com alimentos e com bom efeito fungistático é o sorbato. Segundo Franco e Bettiol (2000), o emprego do sorbato de potássio no controle de bolor verde em pós-colheita de citros (*Penicillium digitatum*) apresentou uma redução de 67,6% quando aplicado em frutos de laranja 'Pera'.

Visando à substituição de produtos químicos com elevados custos e riscos ambientais e toxicológicos ao homem, animais e ambiente, o efeito deletério sobre os organismos e restrições impostas pelo mercado consumidor, sobretudo para exportação, têm motivado a busca por novas medidas de proteção contra as doenças. Pesquisas realizadas in vitro têm indicado o potencial de vários produtos alternativos no controle de fungos fitopatogênicos.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência do emprego de extratos e óleos essenciais vegetais, microrganismos antagonistas, indutores de resistência e substâncias antissépticas como alternativas e no controle do fungo *Colletotrichum musae*, agente de podridão pós-colheita da banana.

## Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará em associação com o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical durante o período de agosto de 2008 a fevereiro de 2009.

### **Obtenção do isolado de *Colletotrichum musae***

O isolado de *C. musae* foi obtido a partir de frutos de banana adquiridos em supermercados de Fortaleza, os quais foram selecionados por exibirem manchas escuras e pontuações alaranjadas, sintomas típicos da antracnose. O isolamento do fungo foi efetuado pela transferência da massa de conídios presentes nos frutos infectados para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar - água (AA) + tetraciclina ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ). Essas placas foram então vedadas com parafilme e incubadas em sala de incubação à temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h. Após três dias, discos com o meio de cultura com estruturas do patógeno foram transferidos para o centro de novas placas com meio BDA (Batata/Dextrose/Ágar) + tetraciclina ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e novamente incubadas sob as mesmas condições acima descritas por um período de sete dias. Após a confirmação de *Colletotrichum musae*, o fungo foi multiplicado em meio de cultura BDA e armazenado à temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  para a realização dos futuros testes.

### **Atividade de extratos e óleos essenciais vegetais sobre *C. musae***

Foram preparados extratos hidroalcoólicos (EHAs) a partir de partes de vegetais de espécies apontadas como produtoras de substâncias bioativas, a saber: folhas e galhos secos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.); folhas frescas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) e botões florais secos de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), obtidos, respectivamente, junto ao Laboratório de Fitoterápicos de Horizonte, CE; Campus do Pici da UFC e Mercado São Sebastião, em Fortaleza, CE. Os óleos essenciais de alecrim-pimenta, cravo-da-índia e eucalipto foram adquiridos de lojas especializadas no comércio de Fortaleza, CE.

Amostras de cada espécie vegetal foram pesadas, nas proporções de 300 g, 195 g e 1.000 g para alecrim-pimenta, cravo e eucalipto, respectivamente. Cada amostra triturada em liquidificador industrial foi imersa em 1.000 mL de uma solução hidroalcolica (1:1 água e etanol) e deixada descansar por três dias consecutivos à temperatura ambiente ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O homogenato obtido foi coado em peneira, acondicionado em frasco Erlenmeyer e estocado sob refrigeração a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a instalação do experimento. Por ocasião dos testes, os extratos obtidos foram submetidos a evaporadores para eliminação do solvente (etanol) e então incorporados em meio de cultura BDA + tetraciclina ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% (p/v), e distribuídos em placas de Petri (20 mL/placa). Os óleos essenciais foram empregados nas concentrações de  $0\text{ }\mu\text{L}$ ,  $25\text{ }\mu\text{L}$ ,  $50\text{ }\mu\text{L}$  e  $100\text{ }\mu\text{L}$  por 100 mL de BDA + tetraciclina ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Um disco (5 mm de diâmetro) de micélio com sete dias de cultivo foi repicado para o centro das placas contendo os extratos e os óleos essenciais, as quais foram vedadas com parafilme e incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h durante sete dias. Placas de Petri, contendo apenas meio de cultura BDA ou o fungicida carbendazin ( $100\text{ mL p.c./100 L de H}_2\text{O}$ ) foram utilizadas como testemunhas absoluta e relativa, respectivamente.

#### **Atividade de microrganismos antagonistas sobre *Colletotrichum musae***

Nos ensaios de controle biológico foram empregados três antagonistas, representados por um isolado de *Trichoderma* sp. (TF1) e um isolado de levedura (IA8), pertencentes à coleção do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes do CCA/UFC, e um isolado de *Bacillus subtilis* obtido do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical.

##### **a) Atividade antagonônica de *Trichoderma* sp. sobre *Colletotrichum musae***

O teste foi efetuado em placas de Petri pelo método de pareamento utilizando-se discos de Agar-água de 5 mm de diâmetro da colônia de *Trichoderma* sp. e *Colletotrichum musae* com sete dias de idade.

Margens das colônias de ambos os fungos foram plaqueadas em meio BDA e em lados opostos da placa de Petri, a 7 cm entre si. Placas inoculadas somente com discos de *C. musae* ou *Trichoderma* sp., pareadas com disco de Agar, foram empregadas como testemunha. As placas foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h durante sete dias. Efetuou-se a avaliação por meio da medição (em cm) do crescimento linear das colônias de ambos os fungos, observando-se a formação de zona de demarcação entre as colônias, além da sobreposição do antagonista sobre o patógeno e a presença ou ausência de zona de demarcação.

b) Atividade antagônica da levedura IA8 e *Bacillus subtilis* sobre *Colletotrichum musae*

As colônias utilizadas para preparo da suspensão da levedura antagonista foram cultivadas em meio seletivo de leveduras YW (3 g de extrato de levedura; 3 g de extrato de malte; 5 g de peptona; 10 g de dextrose; 17 g de agar; 1.000 mL de água destilada) a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h, repicadas 3 vezes consecutivas, a intervalos de 24h. A partir da última repicagem, obteve-se a suspensão de células, pela adição de 10 mL de solução salina esterilizada à superfície do meio, efetuando-se a raspagem com auxílio da alça de Drigalski. Após duas diluições consecutivas, obtidas pela transferência de 1 mL da suspensão original para tubos de ensaio com 9 mL de solução salina, obteve-se a concentração final ( $10^7$  ufc/mL) usada no ensaio.

Neste estudo, empregou-se o método do funil, utilizando-se um funil de vidro, com abertura de 7 cm de diâmetro, o qual teve sua parte mais larga imersa na suspensão da levedura e, em seguida, a suspensão retida nos bordos da boca do funil era transferida para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA. A cada imersão do funil na suspensão antagonista, ele era desinfestado com álcool e então flambado.

O isolado de *B. subtilis* foi adquirido já formulado e pronto para aplicação na dose de 1 mL/L de H<sub>2</sub>O. Para o teste in vitro, utilizou-se (100  $\mu\text{L}$ /100 mL de BDA). As placas da levedura e *B. subtilis* foram

incubadas em sala de crescimento com temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. No centro dessas placas, colocou-se um disco de ágar de 5 mm de diâmetro contendo estruturas de *C. musae*, obtidos de colônias com sete dias de idade. No caso da levedura, a inoculação procedeu-se após 24 h. Como testemunhas, utilizaram-se placas de Petri contendo meio BDA, sendo as suspensões da levedura e *B. subtilis* substituídos por solução salina esterilizada. As placas assim preparadas foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h durante sete dias.

### **Atividade de indutores de resistência sobre *Colletotrichum musae***

Os indutores de resistência testados foram acibenzolar-S-metil (BTH ou Bion<sup>®</sup>), o fosfito de potássio (FP) e o ácido salicílico (AS). O primeiro foi empregado na dose de 0,05 g do produto comercial, o FP a 300  $\mu\text{L}$  e o AS a 0,3 g, todos incorporados a 100 mL do meio BDA + tetraciclina (50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), com o meio de cultura ainda fundente. O patógeno *Colletotrichum musae* foi introduzido na forma de discos de micélio para o centro das placas de Petri contendo o meio de cultura BDA com os indutores, as quais foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h durante sete dias.

### **Atividade de substâncias antissépticas sobre *C. musae***

Foram testadas duas substâncias antissépticas, o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e o hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ); e foi empregada uma substância com propriedade antisséptica e conservante, o sorbato de potássio ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2\text{K}$ ). As doses utilizadas foram de 100  $\mu\text{L}$ , 0,1 g e 25 mL de cada uma dessas substâncias, que foram incorporadas a 100 mL de meio de cultura BDA + tetraciclina (50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), contido em placas de Petri, do mesmo modo que as substâncias do ensaio anterior. O patógeno foi introduzido no meio conforme descrito no item anterior e as placas de Petri incubadas nas mesmas condições acima descritas.

### **Avaliações e análises estatísticas**

A atividade fungitóxica dos extratos e dos óleos vegetais, dos microrganismos antagonistas, dos indutores de resistência e das

substâncias antissépticas foram determinadas por meio da medição do diâmetro das colônias do patógeno, sete dias após instalação do experimento, sendo o percentual de inibição calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = (C_0 - C_1) \times 100/C_0,$$

em que

$C_0$  é o crescimento da testemunha

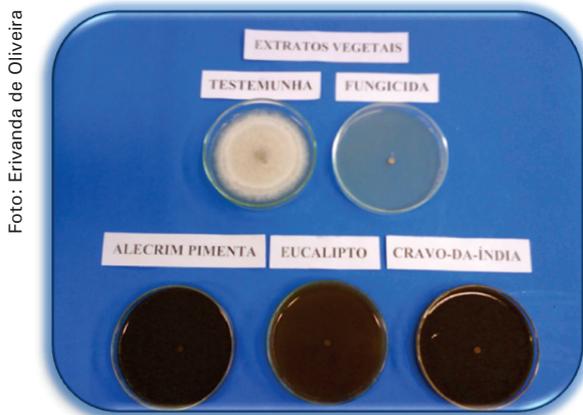
e  $C_1$  é o crescimento do tratamento.

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados com cinco repetições. Cada parcela experimental foi representada por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando-se o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## Resultados e Discussão

### **Atividade de extratos e óleos essenciais vegetais sobre *Colletotrichum musae***

A resultante visual da ação dos extratos sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum musae* pode ser observada na Figura 1. Verificou-se que o tratamento com o alecrim-pimenta e com o cravo-da-índia foram efetivos, equivalendo ao tratamento com fungicida que inibiu o crescimento micelial do patógeno em 100%, em todas as concentrações testadas (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%). Contudo, nesses dois extratos, as concentrações empregadas não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. No tratamento com extrato de eucalipto, nas diferentes concentrações (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%), verificou-se inibição do crescimento micelial à medida que se aumentava a concentração do extrato, com valores percentuais de 37%, 52%, 69%, 74%, 89% e 97%, respectivamente.



**Figura 1.** Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae*.

A redução do crescimento micelial de patógenos, utilizando extratos de alecrim-pimenta, foi constatada por diversos pesquisadores em vários patossistemas. Segundo Matos e Oliveira (1998), alecrim-pimenta possui princípios ativos, como o timol e o cravacrol, que são responsáveis por sua ação antimicrobiana. Essa ação foi evidenciada posteriormente em estudos realizados por Mota et al. (2003), testando o efeito dessa espécie no controle de *Lasiodiplodia theobromae*. Esses autores conseguiram uma inibição do crescimento micelial de 100% testando extratos e óleos essenciais obtidos de folhas de *Lippia sidoides*. Júnior Souza et al. (2009), estudando o efeito fungitóxico dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Psidium guayava* var. *pomifera*, contra *Colletotrichum gloeosporioides* observaram que, a partir da concentração de 1  $\mu\text{L/mL}$ , os óleos essenciais de todas as espécies vegetais tiveram efeito na inibição total da germinação dos conídios. As espécies *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *L. citriodora*, *C. citratus* inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo.

Na forma de extrato e óleo, o cravo-da-índia apresentou grande eficiência como agente antimicrobiano, sugerindo-se que essa ação

foi devida ao eugenol (4-alil-2-metoxifenol) ou ao cariofileno (um hidrocarbono insaturado) ou a essas duas substâncias que são os principais constituintes dessa planta medicinal (PEREIRA, 2001; AMARAL, 2005). Esses resultados foram confirmados por Costa et al. (2006) sobre o efeito de diferentes concentrações do extrato (2.000 e 3.000 ppm) na total inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium perillum* e *Sclerotium rolfsii*. Esses resultados divergem dos obtidos por Silva (2008), que não verificou diferença significativa da testemunha em relação ao óleo essencial do cravo-da-índia em meio de cultura BDA sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, bem como quando aplicado sobre o fruto de mamão em nenhuma das condições avaliadas.

Em relação ao extrato de eucalipto, Fiori et al. (2000), utilizando 20% a 40% do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* na inibição do crescimento micelial de *Didymella bryoniae*, comprovaram a ação fungitóxica dessa espécie. De acordo com Rodrigues et al. (2006), o eucalipto possui, na sua composição química, diversos compostos secundários como o citronelol, geraniol, isopulegol, pineno, cineol, guaiol, estragol, gelemento, nopineno, canfeno, mirceno e bcimeno aos quais se atribuem diferentes potenciais fungitóxicos sobre os fungos *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Botrytis cinerea* Pers. e *Bipolaris sorokiniana* Sacc.

Na Figura 2, pode ser visto o efeito dos três óleos essenciais testados (alecrim-pimenta, cravo-da-índia e eucalipto) no crescimento micelial do fungo em estudo. O óleo essencial de eucalipto nas doses testadas (25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L) não afetou o crescimento micelial do patógeno.

Comparando-se as médias de crescimento micelial do patógeno, verificou-se que os óleos de alecrim-pimenta e o de cravo-da-índia tiveram efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno semelhante aos dos extratos dessas mesmas plantas. No caso do cravo-da-índia, seu efeito inibidor foi igual ao do fungicida, ou seja, 100%, em todas as 3 concentrações testadas (25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L).



Foto: Erivanda de Oliveira

**Figura 2.** Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae*.

Em relação ao alecrim-pimenta, o efeito inibidor foi menor apenas à menor concentração, contudo, essa não diferiu estatisticamente das outras concentrações, as quais foram semelhantes à inibição exercida pelo fungicida. Quanto ao óleo de eucalipto, houve pouco efeito na inibição do crescimento do patógeno para todas as concentrações testadas. Não houve diferença estatística dessas concentrações com a testemunha.

A eficiência do alecrim-pimenta pela adição de frações da tintura ou do óleo essencial in vitro no controle dos fungos no campo e em armazenamento (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus* sp.) foi demonstrada por Pessoa et al. (1996), que obtiveram significativa ação inibitória desses patógenos, marcadamente para fração de 10 mL/100 mL (10%) em relação à testemunha.

Amaral (2005), avaliando a ação antifúngica do óleo de cravo nas concentrações de 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,5%, em amostras de sementes de soja, feijão, arroz e milho, obteve completa inibição da

microbiota fúngica a partir de 0,025%, exceto para amostras de arroz, cuja concentração mínima inibitória foi de 0,05%.

Os resultados obtidos com o óleo de eucalipto neste trabalho diferem daqueles obtidos por Alves et al. (2002), que relataram a eficiência dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. e *Eucaliptus citriodora* Hook. no controle in vitro, da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotrichum musae*. Fiori et al. (2000) observaram uma inibição de 100% com o óleo essencial de *Eucaliptus citriodora*, *Cymbopogon citratus* no desenvolvimento in vitro do crescimento micelial de *Didymella bryoniae*.

### Atividade de microrganismos antagonistas sobre *Colletotrichum musae*

A ação direta de microrganismos antagonistas no crescimento de *C. musae* in vitro pode ser observada na Figura 3, na qual se verifica que aqueles microrganismos já consagrados como agentes de controle biológico, ou seja, o *Trichoderma* sp. e o *B. subtilis*, foram capazes de inibir o crescimento de *C. musae*.

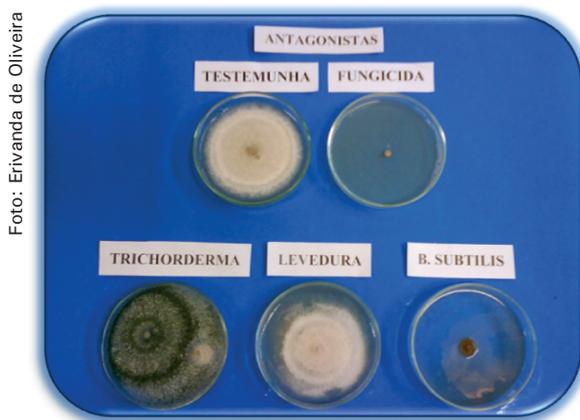


Foto: Erivanda de Oliveira

**Figura 3.** Inibição do crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae* por microrganismos antagonistas.

Com base nos resultados obtidos nesse experimento, pode-se afirmar que ocorreram diferenças significativas entre os antagonistas testados quanto à capacidade de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum musae*, quando comparados à testemunha. *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* apresentaram os melhores resultados com índices de inibição de 84% e 74%, respectivamente, não diferindo significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Verificou-se que *Trichoderma* sp. teve um crescimento contínuo sobre o meio de cultura, inibindo o crescimento do patógeno observado pela zona de demarcação na área de encontro dos dois organismos (Figura 3).

Lima e Pessoa (2000), ao estudarem o efeito in vitro de quatro isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento de *Fusarium moniliforme*, observaram percentuais de inibição de crescimento micelial do fitopatógeno próximo a 50%.

Mahadthanapuk et al. (2007), testando a ação de três espécies dos bacilos (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*) sobre a germinação de *Colletotrichum musae*, nas concentrações de  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$  e  $4 \times 10^8$  (ufc/mL) comprovaram que, para as concentrações a partir de  $2 \times 10^8$  ufc/mL, todas as três espécies apresentaram um absoluto efeito inibitório (100%) sobre a germinação de conídios em comparação ao controle (2%). O *Bacillus subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006). Florianowicz (2001) constatou eficiente atividade antifúngica de *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii* e *L. lactis* contra *Penicillium expansum*.

Neste trabalho, os resultados obtidos para o efeito da Levedura IA8 foram menos efetivos, com reduções de apenas 10,2% no crescimento micelial do patógeno. Essa levedura, por sua vez, mostrou-se superior ao tratamento controle.

Segundo Castoria et al. (1997), algumas leveduras têm a capacidade de despolimerizar a parede celular de determinados fungos

fitopatogênicos. Essa atividade está relacionada com a produção e liberação de enzimas, destacando-se a  $\beta$ -1,3-glucanase. Os autores ainda afirmam que a competição por nutrientes também é um tipo de atividade antagônica desses fungos, observando atividade de *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula glutinis* contra *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. Para Saligkarias et al. (2002), esse fato é atribuído à grande habilidade que essas leveduras têm em se proliferarem rapidamente, competindo assim por espaço e nutriente.

Embora os mecanismos de ação dos antagonistas aqui avaliados não tenham sido determinados na presente pesquisa, supõe-se que substâncias micostáticas ou fungicidas difundíveis no meio possam estar envolvidas no processo de inibição, tendo em vista a redução significativa do crescimento de *Colletotrichum musae* na presença dos mesmos.

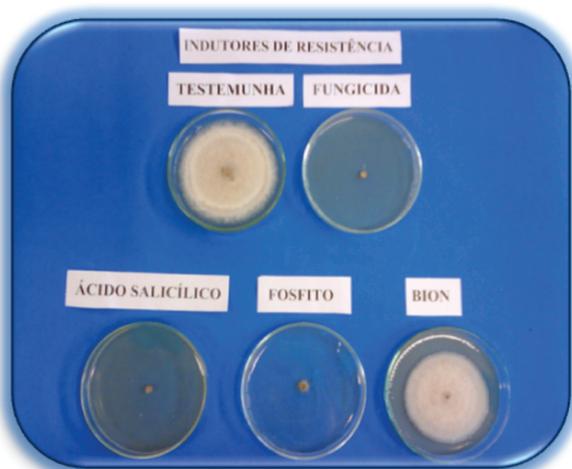
#### **Atividade de indutores de resistência sobre *Colletotrichum musae***

Na Figura 4, pode-se observar a influência de cada indutor testado sobre o crescimento micelial de *C. musae*. Esperava-se que o indutor não tivesse efeito tóxico sobre o patógeno desafiante (BONALDO et al., 2005); contudo, verificou-se que tal premissa necessita ser revista, pois os três produtos exerceram algum efeito inibidor sobre esse patógeno, provavelmente em função da dose empregada.

Os produtos comerciais fosfito de potássio e ácido salicílico foram os mais efetivos na inibição do patógeno, com percentual de inibição de 91,8% e 100%, diferindo significativamente da testemunha ao nível de 5% de probabilidade. O resultado para acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>), embora considerado de baixa eficiência, mostrou-se superior à testemunha com 30% de inibição.

Lopes (2008), ao avaliar a ação fungitóxica in vitro de diversos fosfitos ("Fitofós-Mg", "Phytogard Zn", "Phytogard K" e "Phytogard Ca") a 50%, 100% e 200% da dose recomendada pelo fabricante, observou que eles foram eficientes na redução do crescimento micelial e na produção de conídios de *C. gloeosporioides* em todas as doses testadas.

Foto: Erivanda de Oliveira



**Figura 4.** Inibição do crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae* por indutores de resistência.

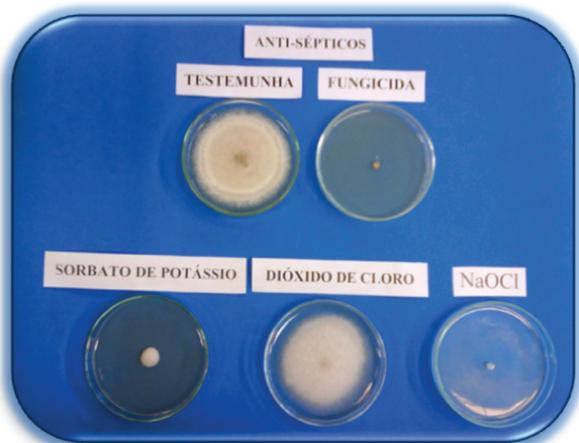
Nojosa et. al. (2009) relatam em seus trabalhos que o acibenzolar-S-metil (ASM) e o fosfito de potássio inibiram em 56,23% e 62, 26%, respectivamente, o crescimento micelial de *Phoma costarricensis* Echandi em cafeeiro nas maiores doses testadas.

Venâncio et al. (2000) relataram a eficiência de ASM no controle de *Cercospora coffeicola* em mudas de cafeeiro, observando o menor número de lesões em plantas tratadas com 50 ppm do produto. O fosfito de potássio na dosagem de 7 mL/L foi eficiente no controle de míldio em mudas de couve-flor de 7 e de 30 dias de idade, apresentando efeito protetor por 15 dias (BÉCOT, et al. 2000).

#### **Atividade de produtos antissépticos sobre *Colletotrichum musae***

O efeito de produtos químicos comumente empregados como antissépticos foi testado no controle *C. musae*. Observa-se, na Figura 5, que dois desses tiveram ação antagônica sobre no crescimento micelial do fungo.

Foto: Erivanda de Oliveira



**Figura 5.** Inibição do crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae* por produtos antissépticos.

Foram constatadas diferenças significativas entre o hipoclorito de sódio (NaClO) e o sorbato em comparação com a testemunha padrão. O NaClO destacou-se, tendo sido tão eficiente quanto o fungicida, com 100% de inibição do crescimento do patógeno. O sorbato de potássio não foi tão eficiente quanto o NaClO e o fungicida carbendazin, mas diferiu significativamente da testemunha com 65,8% de inibição de *Colletotrichum musae*.

Apesar de relatos de vários patógenos controlados pelo dióxido de cloro, tais como *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* e *Penicillium expansum* (SPOTTS; PETERS, 1980) e *Monilinia laxa* (MARI et al., 1999), observou-se neste trabalho que esse produto não foi eficiente na inibição de *C. musae*. Confirmou-se a eficiente ação desinfestante promovida pelo hipoclorito de sódio, equivalente à do fungicida, na completa inibição do crescimento micelial do patógeno estudado.

Silva et. al. (2009), comprovando a eficiência de tratamentos alternativos no controle de *Pyricularia grisea* em sementes de trigo, revelaram que o tratamento com hipoclorito de sódio, apesar de reduzir a germinação da semente (46%), foi eficiente no controle desse

patógeno, pois reduziu a incidência inicial de 57,7% para 2,25%, e a transmissão do patógeno para plântulas de 39,7% para 0,5%.

## Conclusões

- Extratos aquosos e óleos essenciais de alecrim-pimenta e de cravo-da-índia inibem o crescimento micelial in vitro de *Colletotrichum musae*.
- *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* são antagonistas contra *C. musae*.
- A ação fungitóxica de indutores de resistência foi demonstrada no presente estudo para o *C. musae*. O ácido salicílico e o fosfito de potássio têm efeito direto sobre o crescimento micelial de *C. musae*.
- O hipoclorito de sódio e sorbato de potássio inibem o crescimento de *C. musae*. O sorbato de potássio tem excelente ação inibitória do crescimento micelial do patógeno, enquanto o dióxido de cloro não foi eficiente na inibição dele.
- Novos estudos serão necessários para o aprimoramento dos agentes vegetais, biológicos e químicos estudados neste trabalho, visando à eficiência no controle de *C. musae*.

## Referências

ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Eficiência de óleos essenciais no controle *in vitro* da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 75, 2002.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. de; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, v. 13, p. 51-80.

AMARAL, M. F. Z. J. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Suplemento, v. 2 n. 2, p. 5-8, 2005

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeitos 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.

BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; MONOT, C.; SILUÉ, D. Phytogard® (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, v. 19, p. 417-425, 2000.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341 p.

BONALDO, S. M.; PASCOLATHI, S. F.; ROMEIRO, S. R. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCOLATHI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.11-28.

CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bacterias endofíticas no controle e inibicao in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CARDOSO, M. das G.; SHAN, A. YU K. V.; SOUZA, J. A. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. UFLA/FAEPE, 2001. 67 p.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V. Beta-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, n. 3, p. 293-300, 1997.

COSTA, R. C.; POLTRONIERI, L. S.; PEREIRA, D. R. S.; SOUZA, A. C. A. C.; SANTOS, I. P.; FECURY, M. M.; XAVIER, J. R. M. Sensibilidade *in vitro* de óleos essenciais no controle de *Corynespora cassiicola*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, Belém, PA. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. p. 35.

COUTO, E. F. E.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, n. 4 p. 406-412, 2004.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G. MIGUEL, M. D.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. **Visão Acadêmica**, v. 7, p. 15-24, 2006.

DANTAS, S. A. F. **Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja:** ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos. 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

DEL PONTE, E. M. (Ed.) **Fitopatologia.net** - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual>>. Acesso em: 02 mar. 2009.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Top production**, Brasil, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/330>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Eficiência do método do flavedo para avaliar a germinação de conídios de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 265-268, 2000.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf

extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal Phytopathology**, v.148, p.483-487, 2000.

FLORIANOWICZ, T. Artificial activity of some microorganisms against *Peicilium expansum*. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 282-286, 2001.

LIMA, C. S.; PESSOA, M. N. G. Efeito de *Trichoderma* spp. e de antagonistas bacterianos sobre *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25 (suplemento), p. 367, 2000.

LOPES, L. F. **Efeitos de aplicações pós-colheita de fosfitos, ácido acetilsalicílico e 1-metilciclopropeno sobre a antracnose do mamoeiro**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

MARIANO, R. L. R.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p 305-324.

MAHADTANAPUK, S.; YU, L. D.; CUTLER, R.; VILAITHONG, T.; ANUNTALABHOCHAR, S. Mutation of *Bacillus licheniformis* using low-energy ion beam bombardment. **Surface Coatings Technology**, v.201, p. 8028-8033, 2007.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira Farmacologia**, v. 79, p. 84-87, 1998.

MARI, M.; CEMBALI, T.; BARALDI, E.; CASALINI, L. Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. **Plant Disease**, v. 83, p.773-776, 1999.

MOTA, W. F. da; SALOMÃO, L. C. C.; CECON, P. R.; FINGER, F. L. Waxes and plastic film in relation to the shelf life of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 51-57, 2003.

NASCIMENTO, L.; NERY, A.; RODRIGUES, L. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, maio 2008.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V., BARGUIL, B. M.; MORAES, S. R. G.; VILAS BOAS, C. H. Effect of resistance inducers on coffee against Phoma leaf spot. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n.1, p. 60-62, 2009.

NGUGIA, H. K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K. S.; SAVELLEA, A. T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v. 33, p. 32-38, 2005.

OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L. M. S. Indução de resistência em

doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.12, p. 343-371, 2004.

PEREIRA, M. C. **Efeito da adição de condimentos no controle de microrganismos, na conservação de produtos de panificação e na inibição de metabólitos produzidos por fungos associados ao café**. 2001. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PESSOA, M. N. G.; OLIVEIRA, J. C. M.; INNECO, R. Efeito da tintura de alecrim pimenta contra fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21 (Suplemento), p. 404, 1996.

PEREZ, J. O. **Caracterização de isolados de *Crinipelis perniciosa*, indução de resistência à vassoura-de-bruxa no cacaueteiro e análise de peroxidases na interação planta-patógeno**. 2002. 81f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

QUERINO, C. M. B.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R. S. B.; MATOS, R. P. de. Efeito de Dois Indutores de Resistência sobre a Severidade do Mal-do Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 239-243, 2005.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA N.; COELHO, R. S. B. Indução de Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Trapcheiphilum* em caupi: eficiência, de indutores abióticos e aticidade enzimática elecitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

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

SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F.T.; EPTON, H.A.S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. **Biological Control**, v. 25, p. 143-150, 2002.

SILVA, C. P.; NOMURA, E.; FREITAS, E. G.; BRUGNARO, C.;URASHIMA, A. S. Eficiência de tratamentos alternativos no controle de *Pyricularia grisea* em sementes de trigo. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p.127-131, 2009.

SILVA, F. C. da. **Efeito in vitro e in vivo dos óleos essenciais sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão**. 2008, 85 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional ASSISTAT para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V. de. Resistência induzida e plantas contra patógenos. In: SILVA, L. H. C. P. da; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. (Ed.) **Manejo Integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 221-234.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p 11-83, set. 2009.

SPOTTS, R. A.; PETERS, B. B. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. **Plant Disease**, v. 64, p. 1095-1067, 1980.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. A. de; VIANA, F. M. P.; GONDIM, D. F. Refrigeração associada à sanitização no controle integrado da podridão em melão. **Revista Caatinga**, v. 26, 2007.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; CATTANIO, M. E. Controle biológico de *Penicillium expansum* em póscolheita de maçãs 'Fuji'. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 445. 2001.

VENTURA, J.A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. DO; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**, Viçosa-MG: UFV, 2002, v. 1, p. 839-938.

VENÂNCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L.; PERES, N. A. R. Novos fungicidas. II – Famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 59-92, 2000.

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. EFFECT OF FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, p. 323-328, 2006.

**Embrapa**

---

***Agroindústria Tropical***

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA