



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**COMPOSTOS ATIVOS DE FOLHAS DE *EUGENIA UNIFLORA* E
SEUS EFEITOS CONTRA MOFO BRANCO CAUSADO POR
SCLEROTINIA SCLEROTIORUM EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.**

JACQUELINE SANTOS MARQUES

GOIÂNIA-GO

2014

JACQUELINE SANTOS MARQUES

COMPOSTOS ATIVOS DE FOLHAS DE *EUGENIA UNIFLORA* E SEUS EFEITOS CONTRA MOFO BRANCO CAUSADO POR *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Petrofeza da Silva.

GOIÂNIA-GO

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Santos Marques, Jacqueline

Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos
contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas
de feijoeiro. [manuscrito] / Jacqueline Santos Marques. - 2014.
XIII, 81 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Petrofeza da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2014.

Bibliografia.

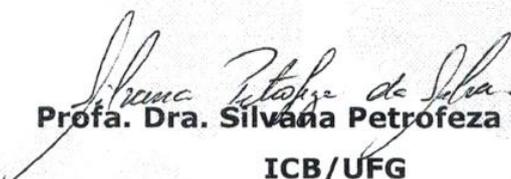
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. flavonoides. 2. elicitores de defesa. 3. *Phaseolus vulgaris*. 4. mofo
branco. I. Petrofeza da Silva, Silvana, orient. II. Título.

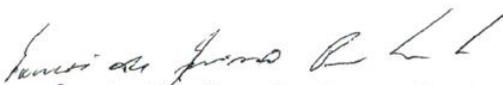
JACQUELINE SANTOS MARQUES

**COMPOSTOS ATIVOS DE FOLHAS DE *EUGENIA UNIFLORA* E SEUS EFEITOS
CONTRA MOFO BRANCO CAUSADO POR *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* EM
PLANTAS DE FEIJOEIRO.**

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Silvana Petrofeza da Silva
ICB/UFG


Profa. Dra. Rosângela Bevitori
Embrapa Arroz e Feijão - GO


Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro
ICB/UFG

Aprovada em: 29 de Setembro de 2014.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Jacqueline Santos Marques		
E-mail:	jacq_sm@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	
Título:	Compostos ativos de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e seus efeitos contra mofo branco causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro.		
Palavras-chave:	flavonoides, elicitores de defesa, <i>Phaseolus vulgaris</i> , mofo branco		
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:			
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/09/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia		
Orientador (a):	Silvana Petrofeza da Silva		
E-mail:	petrofez@uol.com.br		
Co-orientador a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 30/10/2014

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Aos meus Pais, Ângela e Bauer e irmã
Jéssica, dedico.

Agradecimentos

A meus pais **Bauer** e **Ângela**, pelo apoio e amor, pessoas responsáveis pela minha personalidade e caráter. À minha irmã **Jéssica** que sempre me deu força e incentivo para minha formação profissional.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a **Silvana Petrofeza da Silva**, pelo profissionalismo e dedicação.

Aos meus colegas de laboratório, **Marília, Camilla Rosa, William** e **Guilherme** pelo companheirismo e amizade, o melhor time que eu poderia ter.

Às minhas primas **Rosângela** e **Luana** pelo o amor e paciência dedicado a mim principalmente durante esta jornada.

Às minhas amigas/irmãs **Suelen** e **Ludiane** que estão sempre presentes nos momentos mais marcantes da minha jornada. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao professor da Faculdade de Farmácia UFG, Dr. **José Realino de Paula** pela colaboração nos experimentos realizados.

Às professoras da Faculdade de Farmácia UFG, Dr^a **Telma Alves Garcia** e Dr^a **Mariângela Fontes Santiago** pela disponibilidade de ceder um reagente.

À **Universidade Federal de Goiás** pela a oportunidade de formação profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Extração e caracterização do extrato etanólico e óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i>	17
3.2 Efeitos do extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , sobre o <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
3.3 Efeitos do tratamento de extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> em plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	24
3.4 Análise estatística	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 CAPÍTULO 01 - Extrato etanólico e flavonoides de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e seus efeitos sobre o mofo branco causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	31

4.2	CAPÍTULO 02 - Óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e seus efeitos sobre o mofo branco causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	53
5	CONCLUSÃO	68
6	PERSPECTIVAS	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química geral dos flavonoides e via metabólica de síntese.	07
FIGURA 2	Estrutura química dos flavonoides quercetina e rutina.	08
FIGURA 3	Representação esquemática do Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	10
FIGURA 4	Plantas de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>) apresentando incidência do mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>).	11
FIGURA 5	Via catabólica de quercetina em <i>Aspergillus sp</i> e <i>Penicillium sp</i> .	13
FIGURA 6	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> sobre o crescimento radial do micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	32
FIGURA 7	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> sobre a viabilidade celular do micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	33
FIGURA 8	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e dos flavonoides, quercetina e rutina sobre o crescimento radial do micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	34
FIGURA 9	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> formados em meio BDA suplementado com extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , quercetina e rutina.	35
FIGURA 10	Viabilidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> desenvolvidos em meio BDA suplementado com extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , quercetina e rutina.	37

FIGURA 11	Microscopia eletrônica de transmissão de hifas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	38
FIGURA 12	Nível de atividade de quercetinasase no sobrenadante de cultura de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	39
FIGURA 13	Nível de atividade de lacase no sobrenadante de cultura de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	40
FIGURA 14	Desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em folhas destacadas de feijoeiro comum previamente tratadas com concentrações crescentes de extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , de quercetina e de rutina.	41
FIGURA 15	Identificação do teor de rutina presente no extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	42
FIGURA 16	Desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	43
FIGURA 17	Atividades enzimáticas durante o processo de infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , quercetina e rutina.	45
FIGURA 18	Acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados a defesa durante o processo de infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , quercetina e rutina.	48
FIGURA 19	Efeito do óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> sobre o crescimento radial do micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	55
FIGURA 20	Percentual de inibição crescimento radial do micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e fluazinam.	56

FIGURA 21	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> formados em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	57
FIGURA 22	Viabilidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> desenvolvidos em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	58
FIGURA 23	Desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em folhas destacadas de feijoeiro comum previamente tratadas com concentrações crescentes de óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	59
FIGURA 24	Desenvolvimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	60
FIGURA 25	Atividades enzimáticas durante o processo de infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	62
FIGURA 26	Acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados a defesa durante o processo de infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Sistema de Gradiente: A = Acetonitrila acidificada 0.2% (Ácido fosfórico), B = Metanol e C = Água 0.05% (ácido fosfórico), utilizando um fluxo de 1 mL/min.	18
TABELA 2	Sequências de iniciadores utilizados no RT-qPCR	30
TABELA 3	Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .	54

RESUMO

Os extratos e óleos essenciais de plantas são moléculas bioativas de grande interesse para a indução de resistência em plantas e no controle de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico e óleo essencial de folhas de *E. uniflora* e duas frações flavonoides comerciais, quercetina e rutina como compostos bioativos para o controle de mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os compostos foram testados sobre patógeno através do crescimento micelial, viabilidade celular, esclerogênese, morfologia celular e aspectos bioquímicos. E sobre o patossistema *Phaseolus vulgaris-Sclerotinia sclerotiorum* foi avaliado aspectos bioquímicos e moleculares (RT-qPCR) envolvidos no mecanismo de defesa da planta, dentro de uma cinética de tratamento e infecção (12, 24 e 48 horas). Os dados mostram que os compostos testados foram significativamente ($P < 0.01$) relevantes na inibição do desenvolvimento e viabilidade celular *in vitro* do micélio e na formação de escleródios do patógeno, sendo observada uma correlação positiva entre percentual de inibição e as concentrações dos compostos avaliadas. A concentração inibitória mínima (MIC) para o *S. sclerotiorum* foi de 0.6% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* e de 100 ppm do óleo essencial. Nos bioensaios em plantas, o tratamento com extrato etanólico ou óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* e rutina inibiram a formação de necrose em folhas de feijoeiro comum com 48 horas após inoculação. A análise bioquímica mostrou que os compostos induzem com 12 horas após tratamento a ativação das principais proteínas relacionadas à defesa da planta, quitinases, β -1,3- glucanase, fenilalanina amônia-liase, peroxidases, e polifenoloxidasas. A análise molecular mostrou que o tratamento com extrato etanólico, quercetina e rutina em plantas saudáveis ativaram genes relacionados à patogênese (PRs) em diferentes tempos dentro da cinética de tratamento, e que tais genes são altamente expressos em plantas infectadas em comparação as plantas pré tratadas e infectadas. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico, flavonoides e o óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* são moléculas bioativas potenciais para reduzir a severidade da doença mofo branco em plantas de feijoeiro comum.

Palavras-Chave: flavonoides, elicitores de defesa, *Phaseolus vulgaris*, mofo branco

ABSTRACT

The extracts and essential oils from plants are bioactive molecules of interest to resistance induction in plants and the control of plant pathogens. The aim this study was to evaluate the effect of the ethanol extract and essential oil from leaves of *Eugenia uniflora* and two commercial flavonoid fractions, quercetin and rutin, as bioactive compounds for the control of white mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The compounds were tested against pathogen through the mycelial growth, cell viability, sclerotia formation, cell morphology and biochemical aspects. And on the pathosystem *Phaseolus vulgaris*-*Sclerotinia sclerotiorum* was evaluated biochemical and molecular aspects (RT-qPCR) involved in the mechanism of plant defense, into a kinetic treatment and infection (12, 24 e 48 hours). The data show that the tested compounds were significantly relevant ($P < 0.01$) to growth inhibition pathogen's mycelium and cell viability *in vitro* and in the formation of sclerotia of the pathogen a positive correlation between percent inhibition and the concentration of active compounds applied was observed. The minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. sclerotiorum* was 0.6% (v/v) ethanol extract of leaves from *E. uniflora* and the 100 ppm of the essential oil. In Bioassays in plants, the treatment with ethanol extract or essential oil from *Eugenia uniflora* and rutin inhibited the formation of necrotic area in common bean leaves 48 hours after inoculation. Biochemical analysis showed that the compounds induced 12 hours after treatment the activation of key proteins related to plant defense, chitinases, β -1,3- glucanase, phenylalanine ammonia lyase, peroxidases and polyphenoloxidases. Molecular analysis showed that treatment with ethanolic extract, quercetin and rutin in healthy plants activated pathogenesis-related genes (PRs) at different times into the kinetic treatment, and that these genes are highly expressed in plants infected compared to the pretreated and infected plants. The results of this research suggest that the effects of the ethanol extract, flavonoids and oil from *Eugenia uniflora* are potential bioactive molecules to reduce the severity of disease white mold in bean leaves.

Key-words: flavonoids, elicitors of defense, *Phaseolus vulgaris*, white mold

1. INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de extratos e óleos vegetais no controle de fitopatógenos

Pesquisas desenvolvidas com extratos e óleos derivados de folhas e frutos de plantas medicinais indicam a prospecção de novas moléculas que apresentem atividade biológica, como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Tais moléculas demonstram diversas aplicações, como na conservação de alimentos, uso farmaterapêutico, na medicina alternativa, indústrias de cosméticos e perfumes e no controle de fitopatógenos de solo (Bakkali et al. 2008).

O controle inadequado de fitopatógenos impulsionou a investigação de moléculas bioativas que apresentem atividade antimicrobiana e protetora de plantas. Os óleos e extratos vegetais representam uma alternativa na investigação de biomoléculas que atuem no controle de fungos fitopatogênicos, com atividade fungistática direta, ou na indução de resistência em plantas, ativando o próprio sistema de defesa da planta (Sangeetha et al. 2013). Tais compostos possuem uma riqueza de compostos secundários, como flavonoides, terpenos, benzenoides, entre outros compostos (Stasi 1996) que podem atuar na interação planta-patógeno (Sangeetha et al. 2013).

Pesquisas desenvolvidas com óleos e extratos vegetais relatam a utilização de tais compostos no controle de doenças de plantas. Como por exemplo, Itako et al. (2008) verificaram a fungitoxicidade dos extratos brutos de *Achillea millefolium* (milefólio), *Artemisia camphorata* (cânfora), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) na esporulação e germinação de conídios de *Alternaria solani* (mancha de alternaria) e os seus efeitos em plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate). Rodrigues et al. (2007) avaliaram o efeito do extrato de *Zingiber officinalis* (gengibre) sobre o crescimento micelial, desenvolvimento de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) e na proteção de plantas orgânicas de *Lactuca sativa* (alface). Soyulu et al. (2007) demonstraram que óleos essenciais de *Origanum syriacum* (orégano) e *Foeniculum vulgare* (erva-doce) inibiram o crescimento micelial e a formação de escleródios de *S. sclerotiorum* e apresentaram efeito protetor em sementes de *Lycopersicon esculentum* (tomate). Siddiqui et al. (2008) demonstraram em campo o efeito

sinérgico de extratos de palha de arroz ou óleo de frutos de palma enriquecidos com *Trichoderma harzianum* sobre o fungo *Choanephora cucurbitarum* (podridão húmida) em plantas de *Abelmoschus esculentus* L. (quiabo), demonstrando uma redução de 85,04% de incidência da doença.

Com o intuito de elucidar a utilização de óleos e extratos como compostos bioativos com atividade microbiana, Hammer et al. (1999) compararam *in vitro* a atividade de 52 extratos e óleos vegetais sobre diversos microrganismos - *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* - e reforçaram que tais compostos atuam efetivamente sobre o crescimento microbiano.

Porém o efeito destes extratos e óleos vegetais sobre a inibição de crescimento celular de microrganismos ainda é pouco compreendido. Segundo revisão bibliográfica de Bakkali et al. (2008), os principais efeitos celulares causados pelos óleos são: citotoxicidade, fototoxicidade, mutagenicidade citoplasmática e nuclear, carcinogenicidade e propriedades antimutagênicas. Por apresentarem uma constituição hidrofóbica, os óleos atravessam a parede celular e a membrana plasmática alterando a estrutura de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e podem causar lise celular (Tolouee et al 2010, Pârvu et al 2013, Shao et al 2013). Estas alterações da morfologia celular também foram observadas por Parveen et al. (2004), os quais avaliaram o tratamento de células de *Saccharomyces cerevisiae* com α -Terpinene, composto comumente encontrado em diversos óleos de planta medicinais como coentro e palmarosa. Neste trabalho a análise dos perfis de expressão gênica por microarray mostrou que o tratamento regulou positivamente genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos e ácidos graxos, estrutura e organização da parede celular e genes de detoxificação celular.

Rasooli et al. (2006) demonstraram por microscopia eletrônica de transmissão o efeito de óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* (tomilho) sobre o crescimento micelial de *Aspergillus niger* (mofo preto). Neste trabalho as hifas crescidas sob tratamento com estes óleos apresentaram diversas alterações morfológicas, como o rompimento da membrana plasmática, perda da integridade e rigidez da parede celular e perda do citoplasma, e propuseram que os óleos apresentam um efeito fungicida devido à propriedade de alterar a síntese de parede celular pelo fungo, afetando assim o seu crescimento.

Da mesma forma os mecanismos bioquímicos e moleculares de resposta de defesa de plantas desencadeados pelo tratamento com óleos e extratos vegetais exige maior elucidação. Sang e Kim (2011) demonstraram que o tratamento com extratos aquosos de compostagem em plantas de pimenta e pepino reduziu a incidência de antracnose causada pelo patógeno *Colletotrichum coccodes*. Ainda neste estudo os autores observaram que este tratamento ativou a expressão das principais proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs) bem como o aumento enzimático de proteínas relacionadas à defesa da planta, β -1,3- glucanase, quitinases e peroxidases.

Neste contexto, os óleos e extratos vegetais apresentam grande potencial para a investigação de moléculas bioativas no controle de fitopatógenos. Dentre as plantas medicinais potenciais para investigação encontra-se a *Eugenia uniflora*.

1.2 *Eugenia uniflora*

A *Eugenia uniflora* pertence classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Myrtales e família Myrtaceae (Cronquist 1981). Popularmente conhecida como pitangueira, é uma árvore arbustiva frutífera com ampla distribuição geográfica, representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas (Williams et al. 1979; Auricchio; Bacchi 2003). Seus frutos apresentam aroma e sabor agradáveis e são ricos em vitamina A e C, apresentando assim alto valor comercial.

Os óleos essenciais e extratos derivados das plantas de *E. uniflora* apresentam composição química diversa e podem ser extraídos de suas folhas, frutos, caules, flores e raízes (Da Costa 2009). São produzidos em vários sítios no interior da célula e são armazenados principalmente nos vacúolos e nos tricomas glandulares (Bakkali et al. 2008).

A caracterização química de óleos essenciais extraídos das folhas de *E. uniflora* demonstrou abundância nos compostos citronelol, geraniol, cineol e sesquiterpenos (Schapoval et al. 1994). Magina et al. (2009) identificaram 65 compostos na caracterização de espécies *Eugenia* (*Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana*, e *Eugenia umbelliflora*), prevalecendo o monoterpeno α -pineno e o sesquiterpeno viridiflorol como compostos majoritários. Maia et al. (1999) demonstraram que os compostos germacreno, β germacreno e curzereno constituem em abundância o óleo essencial de folhas e galhos *E. uniflora*. Melo et al.

(2007) demonstraram que os compostos voláteis curzereno e β curzereno foram identificados com maior abundância e a análise por cromatografia gasosa-olfatometria (CG-O) demonstrou que os compostos mais significantes no aroma do óleo de folhas de *E. uniflora* são furanoelemeno, β furanoelemo e germacreno. Peixoto et al. (2010) identificaram curzereno, β germacreno, e β curzereno, como compostos majoritários.

A caracterização de extratos etanólicos de frutas de diversos gêneros da família Myrtaceae (*Eugenia*, *Myrciaria*, *Syzygium*), a qual a espécie *E. uniflora* pertence, demonstrou a presença de compostos fenólicos com ação antioxidante, como cianidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-glicosídeo, ácido elágico, kaempferol, miricetina, quercetina e rutina (Reynertson et al. 2008). Diversos trabalhos caracterizando o extrato bruto e etanólico de folhas e frutos de *E. uniflora* demonstraram abundância em taninos hidrolisáveis, antraquinonas, quercetina, kaempferol, galocatequina e miricetina (Alice et al. 1991; Lee et al. 1997; Hoffmann-Ribani et al. 2009).

Pesquisas desenvolvidas na área de farmacologia demonstraram a utilização do óleo essencial e os compostos polifenólicos extraídos de folhas e frutos, principalmente na medicina popular, como diurético, antirreumático, antifebril e anti-inflamatório. Tais propriedades podem ser atribuídas a compostos secundários como flavonoides, terpenoides, taninos hidrolisáveis, antocianinas e esteroides (Schapoval et al. 1994; Lunardi et al. 2001). Estudos fisiológicos do efeito do extrato bruto de *E. uniflora* L. em ratos demonstraram efeito anti-hipertensivo e anti-hipotensivo (Consolini et al. 1999; Consolini; Sarubbio 2002). Amorim et al. (2009) demonstraram que a administração oral de óleos essenciais de *E. uniflora* e suas frações furanosesquiterpenos apresentaram efeitos na percepção e transmissão de estímulos responsáveis pela dor e na hipotermia em ratos.

Além da aplicação como potenciais compostos de uso medicinal, os óleos e extratos de *E. uniflora* apresentam ampla atividade anti microbiológica e antioxidante. Segundo Coelho de Souza et al. (2004), o óleo essencial de *E. uniflora* apresentou ação antimicrobiana significativa para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*. Os extratos de *E. uniflora* já foram descritos por inibirem a DNA polimerase de Epstein-Barr vírus (Lee et al. 1997); apresentarem atividade antioxidante inibindo a peroxidação lipídica e removendo os radicais livres (Auricchio; Bacchi 2003); e apresentarem ação antimicrobiana sobre bactérias

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* (Holetz et al. 2002; Coutinho et al. 2010). Xin et al. (2012) demonstraram a atividade do linalol, composto comumente encontrado em óleo essencial de *E. uniflora*, como indutor de defesa em arroz em situações de herbivoria. Porém há poucos estudos que elucidem os efeitos de óleos essenciais e extratos brutos de *E. uniflora* sobre fungos fitopatogênicos e suas ações na interação planta-fungo.

1.3 Flavonoides

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente encontradas no reino vegetal. Neste grupo inclui os fenóis, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e ligninas e são amplamente estudados por estes apresentarem atividades farmacológicas, antioxidantes e antimicrobiana (Pietta 2000; Soares 2002).

No grupo dos flavonoides encontram-se as flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas. Outras classes menores de flavonoides incluem biflavonas, chalconas, auronas e cumarinas. Os flavonoides são compostos sintetizados nas plantas a partir de aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, e o malonato. Seu esqueleto básico é constituído por 15 átomos de carbono organizados em três anéis (C6-C3-C6) (Pietta 2000). A figura 1 representa a estrutura química básica e a via de síntese dos flavonoides em plantas.

Os flavonoides desempenham diversas funções nas plantas, podendo atuar como sinalizadores para polinização de insetos, possuem propriedades antioxidantes e neutralizadoras de radicais livres, atuam como catalisadores na fotossíntese e/ou como reguladores de canais de ferro na fosforilação, apresentam alta capacidade de remover íons de metais pesados e proteção contra as espécies reativas de oxigênio (Pietta 2000).

Os flavonoides quercetina e kaempferol são amplamente encontrados em plantas de interesse comercial, como cebola, couve, alho, maçã, brócolis além de chás e vinho tinto. A quercetina apresenta distintas formas estruturais como a 3-O-rutinosídeo-quercetina (rutina), quercetina 3-O-hexosídeo, quercetina 3-O-pentosídeo que coexistem na constituição de folhas e frutos (Erlund 2004) (Figura 2).

A análise, por espectrometria de massa, de extratos provenientes de diferentes variedades de frutos de *E. uniflora* identificaram os seguintes compostos fenólicos, miricetina 3-O-hexosídeo, miricetina 3-O-pentosídeo, miricetina 3-O-

ramnósido, quercetina 3-O-hexoside, quercetina 3-O-pentoside, quercetina 3-O-ramnósido e miricetina deoxyhexoside-galato (Celli et al. 2011).

Muitas espécies de plantas ricas em flavonoides têm sido utilizadas como plantas medicinais, atuando como antioxidantes e neutralizadoras de radicais livres em sistemas biológicos, além de atividade antiinflamatória, antitumoral e antibactericida (Zhu et al. 2004).

Zhu et al. (2004) avaliando o extrato de *Biota orientalis* sobre ratos demonstrou também a presença de quercetina e rutina e as suas atuações na regulação dos níveis de ácido úrico e hiperuricemia. Basile et al. (2000) caracterizaram a presença de vários flavonoides como rutina, quercetina e kaempferol no extrato de folhas de *Castanea sativa* (castanheira). Neste trabalho o extrato e as frações flavonoides foram avaliados para atividade antibactericida sobre cepas gram positivas e gram negativas no qual a quercetina e rutina apresentaram maior efeito antimicrobiano.

Apesar de os flavonoides terem várias propriedades relatadas ainda é pouco compreendido quais os mecanismos e os alvos celulares específicos destes compostos que proporciona sua atividade antimicrobiana. Infere-se que o efeito antibactericida da quercetina sobre cepas de *E. coli* seja devido a inibição da DNA girase e clivagem do DNA (Ohemeng et al. 1993; Plaper et al. 2003). Porém pouco se sabe sobre o efeito destes compostos sobre fungos fitopatogênicos, sendo assim moléculas potenciais na investigação de novos compostos ativos que atuem na proteção de plantas ao ataque de patógenos.

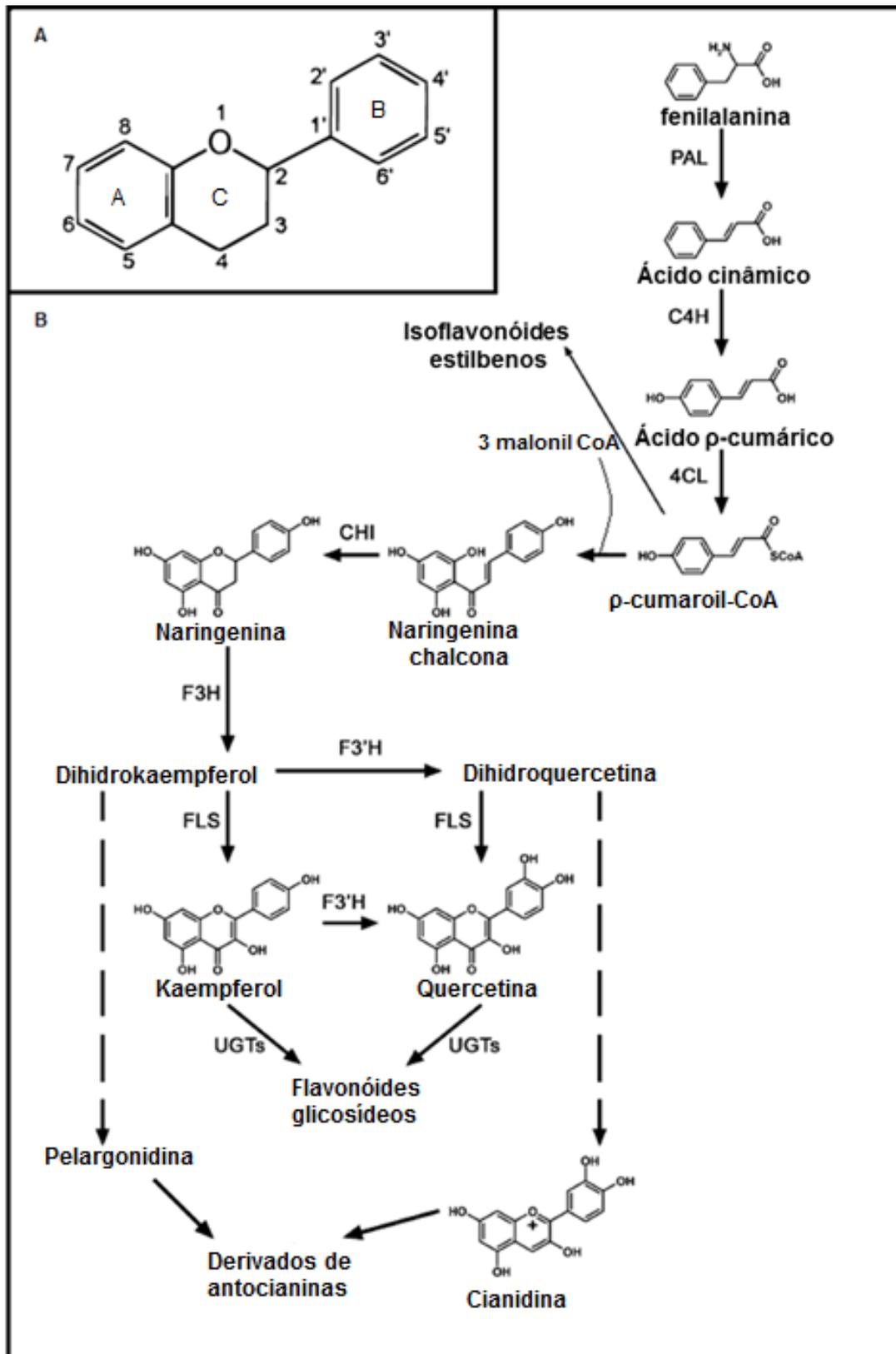


Figura 1 – Estrutura química geral dos flavonoides e via metabólica de síntese.

Adaptado de Besseau et al. (2007). PAL: fenilalanina amônia-liase; C4H: C4- hidroxilase; 4CL: 4-cumaroil-CoA ligase; CHI: chalcona isomerase; F3H: flavanona 3-hidroxilase; F3'H: flavanona 3'-hidrolase; FLS: flavonol sintases; UGTs: glicosiltransferases.

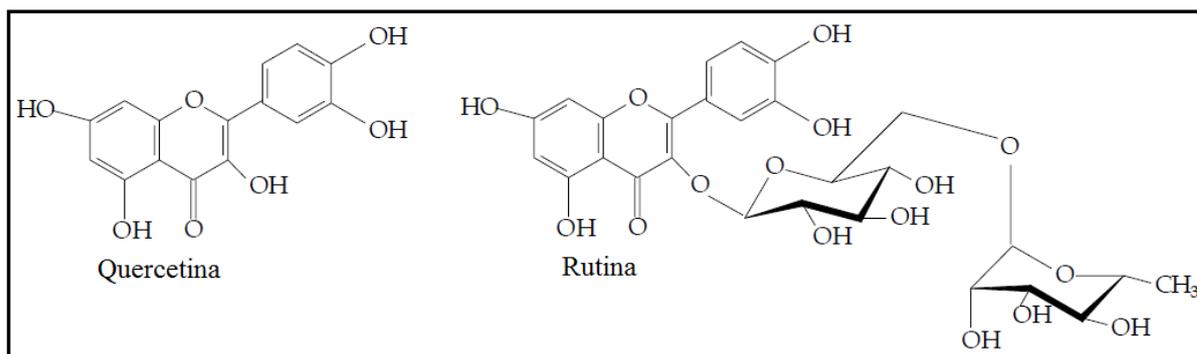


Figura 2 – Estrutura química dos flavonoides quercetina e rutina.

1.4 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary pertence ao filo Ascomycota, ordem Helotiales, família Sclerotineacea, gênero *Sclerotinia*. É um fungo de solo necrotrófico e de grande importância econômica. Ataca 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas (Bolton et al. 2006). Acomete diversas culturas economicamente importantes, principalmente soja, feijão, girassol, canola, ervilha, fumo, tomate, batata, nabo e alfafa (Leite 2005; Garcia et al. 2012).

Este fungo produz estruturas de resistência denominadas escleródios. Estas estruturas são formadas em condições limitadas de nutrientes a partir de ramos laterais de uma ou mais hifas primárias. Durante a esclerogênese, estas hifas se compactam constituindo assim uma massa de micélio agregado revestido por uma camada de melanina, constituindo assim o escleródio. Esta camada de melanina é responsável pela proteção a condições adversas do ambiente e ao ataque de microrganismos do solo. As formas dos escleródios são dependentes da cultura agrícola em que são formados e geralmente apresentam formato circular e irregular (Bolton et al. 2006). Um fator importante para a formação de escleródios é o pH. Rollins; Dickman (2001) demonstraram que o pH ácido é ideal para a formação de estruturas de resistência. O ambiente ácido é formado a partir do acúmulo de ácido oxálico secretado pelas hifas do fungo proporcionando condições favoráveis ao desenvolvimento dos escleródios.

Os escleródios são estruturas de propagação e sobrevivência do fungo, podendo permanecer viáveis no solo por longos períodos, nas condições mais adversas de temperatura, umidade, luz e nutrientes. Quando em condições favoráveis de baixa temperatura, alta umidade e na presença de um hospedeiro

suscetível, o escleródio pode germinar de duas formas, geminação miceliogênica ou carpogênica (Bolton et al. 2006; Görge et al. 2009).

O ciclo de vida de *S. sclerotiorum* apresenta duas etapas, miceliogênica e carpogênica (Figura 3).

Na etapa miceliogênica, o escleródio germina em novas hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas que entram em contato com os tecidos da planta iniciando o processo de infecção (Bolton et al. 2006).

Na etapa carpogênica, o escleródio germina produzindo apotécios e, posteriormente, ascósporos aéreos que infectam partes aéreas de plantas hospedeiras (Bardin; Huang 2001). Para formação do apotécio, hifas germinam a partir do escleródio formando um tubo que se diferencia em um asco em formato de taça (Figura 3). Este quando maduro produz milhões de esporos, os ascósporos, que são ejetados para o ar e ao aderirem à parte aérea da planta germinam micélio com 2 a 3 dias. A partir deste ascósporo é formado um apressório que penetra na epiderme iniciando o processo de infecção (Bolton et al. 2006).

Desta forma o processo de invasão em diversas plantas hospedeiras inicia-se pelo contato dos ascósporos principalmente em flores senescentes e outros tecidos. A germinação carpogênica é dependente de alguns fatores, como a origem dos isolados dos escleródios, exigindo que estes estejam funcionalmente maduros, pré-condicionados a 2-3 cm na camada superior do solo, umidade e temperatura de 15° C por um período entre 10 a 40 dias. E cada apotécio pode produzir até 3×10^7 ascósporos (Abawi; Grogan 1979).

Além dos ascósporos e escleródios o fitopatógeno *S. sclerotiorum* pode ser disseminado através da semente. O micélio fica dormente no endosperma da semente podendo transportar o patógeno para outras áreas (Schwartz 1989).

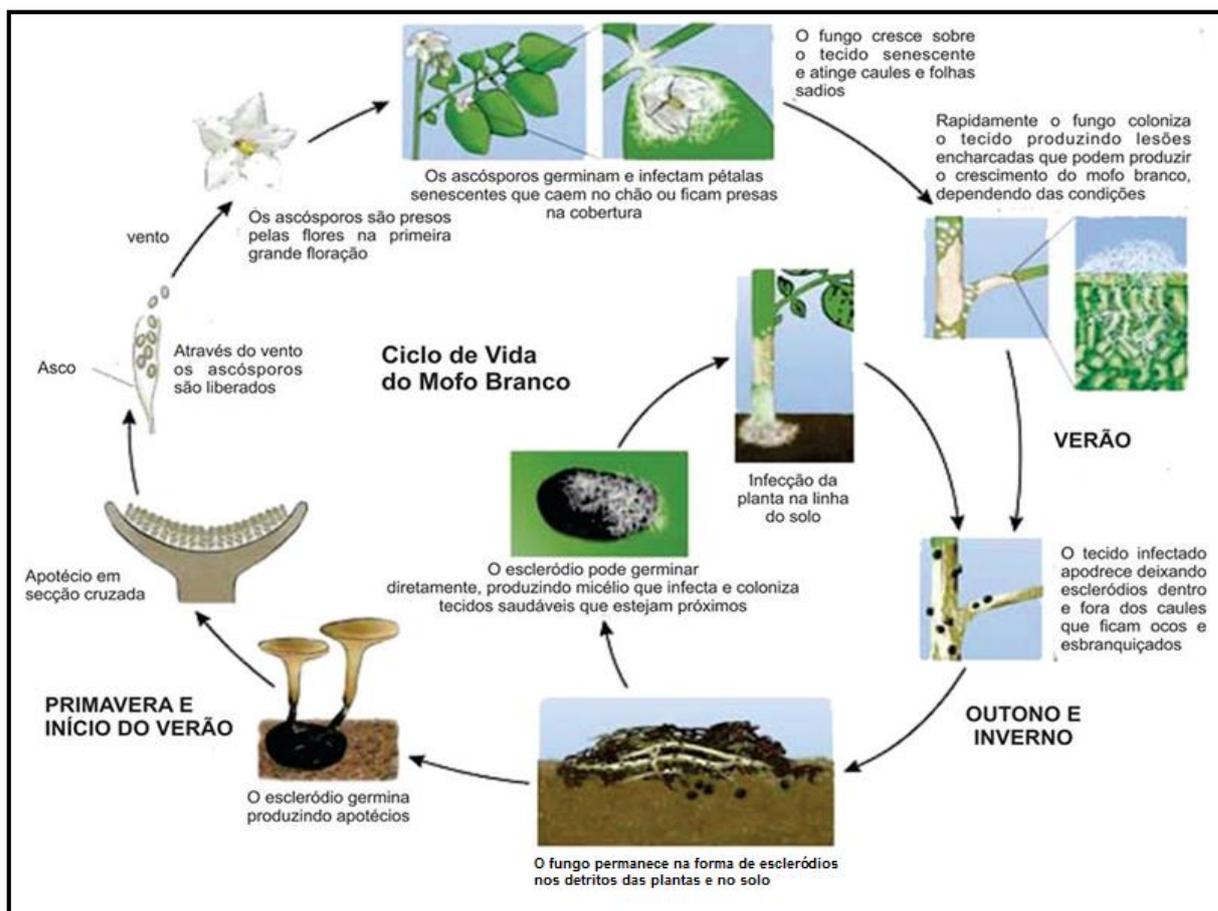


Figura 3 - Representação esquemática do Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Adaptada de <http://www.potatodiseases.org/whitemold.html>.

1.5 Patossistema *Phaseolus Vulgaris-Sclerotinia Sclerotiorum*

O feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales e família Fabaceae. No Brasil o período predominante de produção de feijão irrigado ocorre de maio a setembro, período no qual há menor percentual de chuvas e umidade relativa mais amena (Rocha et al. 2003). O feijão denominado "de inverno" é cultivado no período seco, sob irrigação e em especial com o uso de pivô central. Porém estas condições de cultivo irrigado são favoráveis para o desenvolvimento de doenças fúngicas, devido à baixa evapotranspiração e a alta umidade do solo proporcionada pela irrigação (Meireles et al. 2000).

O mofo branco, causado pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, destaca-se como o principal fungo necrotrófico que ataca a cultura de feijoeiro. Tal doença pode causar perda total da produção, perda da qualidade de sementes e grãos e até inviabilizar o seu cultivo (Yorinori et al.1997).

Os sintomas característicos do mofo branco são observados principalmente após a floração. Acomete principalmente as inflorescências e axilas dos ramos e folhas e progride com as manchas marrons pelas folhas, caules, ramos e vagens (Figura 4). Após o contato inicial, no local de lesão forma-se uma massa aquosa e o tecido necrosado é coberto por micélio branco de aspecto cottonoso (Bolton et al. 2006). A doença pode progredir rapidamente em uma planta individual ou entre plantas próximas (Harrison et al. 2012).



Figura 4 - Plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) apresentando incidência do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Adaptado de Lobo Junior et al. (2009).

Durante o processo inicial de infecção o fungo *S. sclerotiorum* secreta ácido oxálico e enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular das células da planta, causando a maceração e necrose do tecido hospedeiro. As enzimas de degradação de parede celular tem a função de degradar os polímeros de pectina, fibras de celulose e hemicelulose em monômeros de simples, os quais servem como fonte de carbono para o fungo, favorecendo assim sua penetração na célula hospedeira (Annis; Goodwin, 1997; Bolton et al. 2006). Dentre estas enzimas inclui as pectinases, celulasas, hemicelulasas, xilanases e proteases (Lebeda et al. 2001).

Assim para melhor compreensão do processo inicial de invasão do *S. sclerotiorum*, Hegedus; Rimmer (2005) propuseram um modelo infecção para este patógeno: Inicialmente o fungo produz o ácido oxálico que promove a acidificação do meio no local de invasão. A secreção do ácido oxálico é um fator de patogenicidade determinante para o processo de infecção, pois permite a ação das enzimas específicas de degradação da parede celular dependentes do pH ácido no tecido a ser macerado, como as poligalacturonases e pectinases. Segundo De Lorenzo G, Cervone (1997) tais enzimas atuam diretamente na degradação da pectina constituinte da parede celular da planta liberando assim oligogalacturonídeos. Estes compostos de pequena massa molecular induz a expressão de outras enzimas de degradação, como celulasas, hemicelulasas, xilanases e proteases as quais dissolvem totalmente a parede celular da planta.

Em adição as proteínas de degradação de parede o *S. sclerotiorum* é capaz de produzir enzimas de detoxificação de metabólitos secundários das plantas (Pedras; Ahiahonu 2005), incluindo os flavonoides e as fitoalexinas. As fitoalexinas são compostos que por definição apresentam baixo peso molecular e são induzidas nas plantas em resposta a diversas formas de stress, como o ataque de fitopatógenos (Bailey; Mansfield 1982). Desta forma, o metabolismo de detoxificação é um mecanismo adicional dos fungos fitopatogênicos para ultrapassar os mecanismos químicos de defesa das plantas. Sexton et al. (2009) caracterizaram uma enzima de detoxificação produzida pelo *S. sclerotiorum*, denominada brassinin glicosiltransferase 1 (SsBGT1). Tal enzima detoxifica por reações de glicosilação a brassinin, uma fitoalexina precursora de várias outras fitoalexinas de crucíferas, demonstrando que tais mecanismos são essenciais para o sucesso de invasão do patógeno.

Outro aspecto no processo de invasão é a secreção pelo *S. sclerotiorum* de oxidoredutases extracelulares. As lacases são uma família de oxidoredutases que apresentam como principais substratos os compostos fenólicos e estão envolvidas na oxidação de fenóis e degradação de lignina, através da redução molecular do oxigênio a água (Leonowicz; Grzywnowicz 1981; Eggert et al. 1996). Coman et al. (2013) demonstraram que fatores como o pH, fontes de nitrogênio e ácido oxálico afetam a produção de lacases pelo *S. sclerotiorum*, sugerindo assim que esta família de enzimas são importantes fatores de virulência do fungo.

Recentes trabalhos demonstraram a atividade de outra oxidorreductase, a quercetina 2,3-dioxigenase, em microrganismos, *Beauveria bassiana* (Costa et al. 2011) *Aspergillus japonicus* e *Bacillus subtilis* (Merkens et al. 2007), *Verticillium dahliae* (El Hadrami et al. 2011), porém para o *S. sclerotiorum* a atividade de quercetina 2,3-dioxigenase ainda não foi descrito. A figura 5 demonstra a via de degradação da quercetina pela ação de quercetina 2,3-dioxigenase em diferentes fungos.

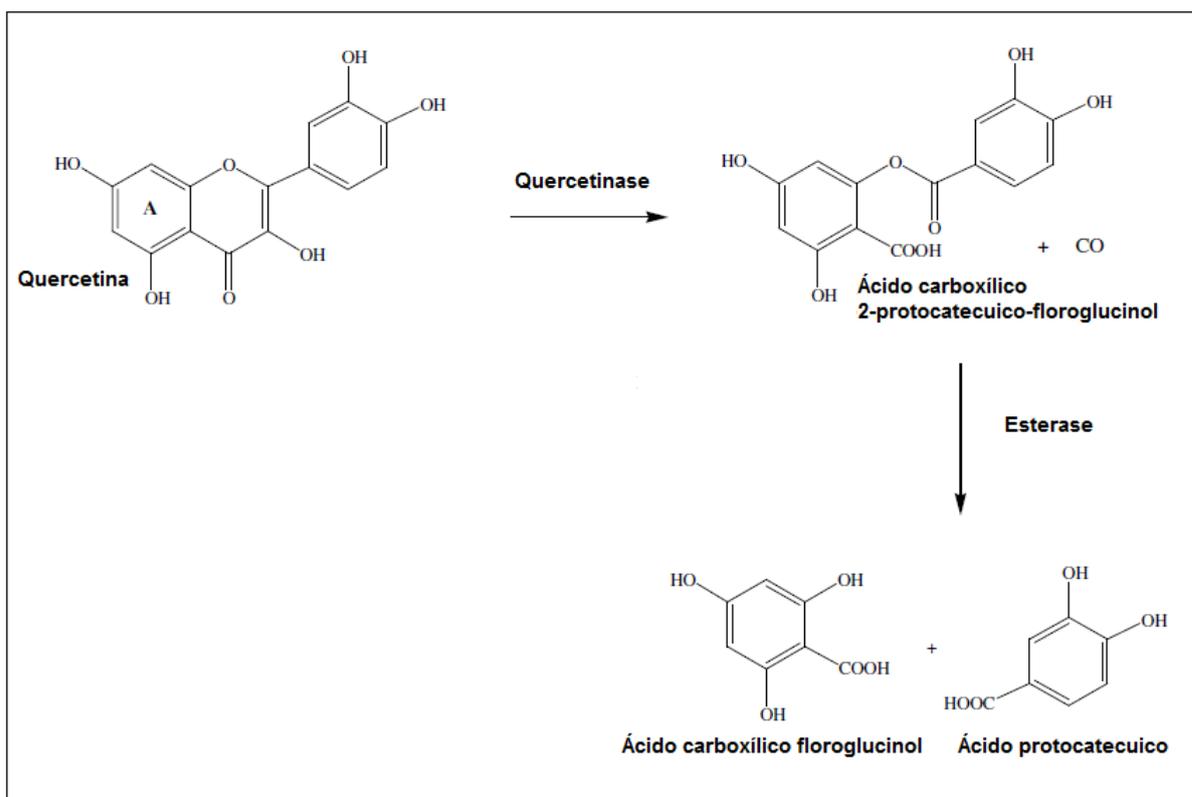


Figura 5 - Via catabólica de quercetina em *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*.
Adaptado de Tranchimand et al. (2005).

1.5.1 Mecanismos de defesa da Planta

O sistema de defesa da planta consiste em dois mecanismos, os pré formados e os pós formados ou induzíveis. Os mecanismos pré-formados são considerados barreiras constitutivas das plantas como as cutículas, ceras, tricomas, estômatos diferenciados, entre outros. E os mecanismos pós formados são expressos após um estresse biótico sendo considerado a formação de papilas, halos, lignificação, formação de uma camada de cortiça, além da libertação de

compostos como fitoalexinas e proteínas relacionadas com a defesa da plantas (PRs e enzimas antioxidantes) (Agrios 2004).

A indução de resistência está associada com duas vias principais, a resistência sistêmica induzida que está associada à síntese de ácido jasmônico e etileno (Van Loon 1997) e a resistência sistêmica adquirida (RSA), que envolve a geração de sinalização celular no período inicial de infecção de fitopatógenos (Kachroo; Robin 2013) e está associada ao acúmulo de ácido salicílico, indução de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), indução da síntese de fitoalexinas, flavonoides e lignina (Van Loon 1997).

Neste contexto a RSA ativa genes envolvidos em diversas respostas de defesa da planta como as quitinases, β -1,3- glucanase, peroxidases e polifenoloxidasas (Van Loon; Van Strien 1999) e genes envolvidos na via do fenilpropanóides como a fenilalanina amônia-liase e na peroxidação de lipídeos, como a lipoxigenase (Sattler; Funnell-Harris 2013).

1.5.2 Controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

Os fungos fitopatogênicos causam doenças que contribuem significativamente para a perda total do rendimento das culturas em todo o mundo (Savary et al., 2006). Em específico, a contaminação do feijoeiro comum pelo fungo *S. sclerotiorum* causador do mofo branco resulta na perda da produção como também na viabilidade dos grãos. Neste contexto o controle do mofo branco é geralmente realizado pela utilização de uma grande variedade de diferentes produtos químicos sintéticos para inibir o crescimento do fungo (Campanhola 2003). Porém o uso generalizado de fungicidas apresenta alguns malefícios, como o custo para aplicação, manuseio inadequado e excessivo, resíduos tóxicos, além de causar sérios riscos à saúde humana e contaminação do meio ambiente (Arcury et al., 2002).

Tais fatores influenciaram na investigação de métodos alternativos de controle da doença e busca de moléculas bioativas que apresentem potencial fungicida ou fungistático e/ou como elicitoras de resistência em plantas. Neste sentido os extratos e óleos de origem vegetal representam fontes úteis para encontrar novos compostos que apresentem caráter antifúngico e de interesse biotecnológico (Bajpai 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do extrato etanólico e óleo essencial de folhas de *E. uniflora* e duas frações flavonoides comerciais, quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) e rutina (3-o-rutinosídeo-quercetina) no desenvolvimento de mofo branco (*S. sclerotiorum*) em plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*), além de avaliar o efeito destes compostos, através de aspectos bioquímicos e moleculares, na resistência sistêmica adquirida por plantas no patossistema *Phaseolus vulgaris-Sclerotinia sclerotiorum*.

2.2 Objetivos específicos/Metas

2.2.1 Extração e caracterização do extrato etanólico e óleo essencial de folhas de *E. uniflora*.

2.2.2 Avaliar o efeito do extrato etanólico e do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, e dos flavonoides quercetina e rutina, sobre diferentes aspectos do desenvolvimento do fungo *S. sclerotiorum*:

- crescimento micelial
- esclerogênese
- morfologia celular
- níveis de atividade de enzimas de detoxificação: quercetinase e lacases

2.2.3 Avaliar o efeito do tratamento com o extrato etanólico e óleo essencial extraído de folhas de *E. uniflora*, e dos flavonoides, quercetina e rutina, sobre o patossistema *Phaseolus vulgaris-Sclerotinia sclerotiorum* através da análise de aspectos bioquímicos e moleculares:

2.2.3.1 Estimar os níveis de atividade de enzimas de resposta de defesa da planta quitinases, β -1,3- glucanase, fenilalanina amônia-liase,

peroxidases e polifenoloxidasas em plantas de *P. vulgaris* submetidas a tratamento com os compostos em teste.

2.2.3.2 Avaliar a expressão temporal de genes de resposta da defesa da planta por meio de PCR em tempo real (RT-qPCR) em plantas de *P. vulgaris* submetidas a tratamento com os compostos em teste durante a interação com *S. sclerotiorum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração e caracterização do extrato etanólico e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*

3.1.1 Material vegetal de *Eugenia uniflora*

As folhas frescas de *E. uniflora* foram colhidas em Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil (latitude 16 ° 28'60 " S, longitude 49 ° 17'00 " W e altitude de 823 m). A planta foi identificada de acordo com uma amostra autêntica depositada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás, sob registro UFG/29859.

3.1.2 Extração do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*

O extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* foi preparado de acordo com o método proposto por Fiuza et al. (2008) com algumas modificações. As folhas de *E. uniflora* L. foram secas a 40° C durante 24 horas e moídas até obtenção de um pó fino. Este pó foi embebido em etanol a 95%, numa proporção de 1:5 (v/v), à temperatura ambiente e agitado ocasionalmente por 72 horas. Esta solução foi filtrada em papel filtro e o extrato resultante concentrado por evaporador rotativo a 40° C e 40 rpm. O resíduo vegetal foi extraído desta mesma forma por duas vezes e o extrato etanólico bruto foi obtido. Este extrato etanólico bruto foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA), na proporção de 1:3 (v/v) e a solução resultante foi esterilizada por filtração utilizando filtro Millipore 0.22 mm e utilizado nos testes *in vitro*.

3.1.3 Identificação do teor de Rutina presente no extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*

A partir do extrato etanólico extraído de folhas de *Eugenia uniflora* foi mensurado o percentual do flavonoide rutina. O teor de rutina foi obtido utilizando coluna Zorbax XDB C18 e o Cromatógrafo Waters e2695 (Massachussets, USA) equipado com detector de Fotodiodo (PDA 2998). A solução padrão de rutina

(Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, catálogo 78095) na concentração de 0.059 mg/mL e a solução de extrato etanólico na concentração de 10.559 mg/mL foram injetadas no cromatógrafo utilizando como fase móvel o sistema de gradiente de acetonitrila acidificada, metanol e água, demonstrado na tabela 1.

O teor de rutina foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Teor} = (\text{Área amostra}/\text{Área padrão}) \times (\text{Concentração Padrão}/\text{Concentração Amostra}) \times 100$$

Onde:

Área rutina (padrão) = 1382756

Área provável de rutina (extrato etanólico) = 621348

Tabela 1 – Sistema de Gradiente: A = Acetonitrila acidificada 0.2% (Ácido fosfórico), B = Metanol e C = Água 0.05% (ácido fosfórico), utilizando um fluxo de 1 mL/min.

Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0-7	15	25	60
7	15	25	60
9	15	25	60
15	15	25	60
18	15	25	60
22	15	25	60

3.1.4 Extração do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* e suas frações voláteis

A extração do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* foi realizada através do processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger de acordo com British Pharmacopoeia (1980). Neste método de extração, foram utilizadas 100 gramas de folhas secas da planta foram submersas em 2.5 L de água destilada em temperatura constante de 100° C no sistema de Clevenger. Após iniciado o processo de destilação, aguardou-se o período de 2 horas. O óleo essencial obtido foi dessecado com Na₂SO₄ e armazenado a 0° C, em frasco de vidro escuro.

O óleo essencial extraído de folhas de *E. uniflora* foi submetido à análise

cromatográfica, em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (CBP – 5; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com um fluxo de 1.0 mL/min de Hélio como gás de arraste. O aquecimento foi realizado com temperatura programada (60° C/2 min; 3° C min⁻¹/240° C; 10° C min⁻¹/280° C; 280 °C/10 min) e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 µL de cada amostra diluída em CH₂Cl₂ na proporção de 1:5.

3.1.5 Análise do teor e da composição química do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*

Os componentes químicos do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* foram identificados por comparação dos espectros de massa e índices de retenção com os componentes mais comuns de óleos essenciais relatados na literatura (Adams 2007). Os índices de retenção foram calculados através da coinjeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C 9 – C 22, e utilização da equação de Van Den Dool; Dec Kratz (1963).

3.2 Efeitos do extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*, sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Os efeitos do extrato etanólico, flavonoides, rutina e quercetina, e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* foram avaliados *in vitro* sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e no desenvolvimento de escleródios.

3.2.1 Cultura do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum* utilizado nos experimentos, linhagem SPS, foi isolado e caracterizado de plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal de Goiás. A manutenção da cultura foi feita em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) suplementado com ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. A cada 4 dias discos de 7 mm de diâmetro foram retirados da borda da cultura do fungo e inoculados em uma nova placa de Petri. A cultura foi incubada em estufa BOD a 20 °C no escuro.

3.2.2 Avaliação da capacidade inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico e do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*

Para analisar a capacidade inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico e do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* sobre o crescimento do fungo *S. sclerotiorum*, discos de 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados em meio BDA enriquecido com concentrações crescentes do extrato etanólico, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 e 2.0% (v/v) ou do óleo essencial, 10.0, 50.0, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 ppm. O meio de cultura BDA sem os compostos foi utilizado como controle do experimento. As placas foram incubadas em estufa BOD a 20 °C e o crescimento micelial do fungo acompanhado. Nos pontos de 24, 48 e 72 horas após inoculação (hai) o crescimento micelial radial foi mensurado em direções ortogonais. Foram utilizadas três repetições por concentração e o percentual de inibição foi calculado em relação ao controle do experimento.

3.2.3 Efeito *in vitro* do extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o crescimento micelial e desenvolvimento dos escleródios do *Sclerotinia sclerotiorum*.

O extrato etanólico, dois compostos flavonoides quercetina e rutina, e o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* foram selecionados para avaliar o efeito sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Discos de 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados em meio BDA enriquecido com 0.25, 0.5 e 1.0% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, 1.25, 2.5 e 5.0 mg/L de quercetina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, Catálogo Q4951); 1.25, 2.5 e 5.0 mg/L de rutina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, Catálogo 78095) e 50, 500, 1500 e 2500 ppm do óleo essencial. O fungicida comercial Fluazinam (3-cloro-N-(3-cloro-5-trifluormetil-2-piridil)- α,α,α -trifluor-2,6-dinitro-p-toluidina) foi utilizado como controle positivo nas concentrações 0.1, 1.0 e 10.0 ppm. O meio de cultura BDA sem os compostos foi utilizado como controle do experimento. As placas foram incubadas em estufa BOD a 20° C e o crescimento micelial do fungo mensurado em direções ortogonais nos pontos de 24, 48 e 72 hai. Foram utilizadas três repetições

por concentração e o percentual de inibição foi calculado em relação ao controle do experimento.

O desenvolvimento dos escleródios foi avaliado aos 15 dias após a inoculação. Os escleródios formados foram quantificados, pesados e medidos com a utilização de um paquímetro digital.

3.2.4 Efeito *in vitro* do extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre viabilidade de escleródios.

Os escleródios formados nas placas com meio BDA enriquecido com 1.0% (v/v) do extrato etanólico de folhas *E. uniflora*, 5.0 mg/L de quercetina e 5.0 mg/L de rutina e 500 e 1000 ppm do óleo essencial foram avaliados quanto a viabilidade de formação de novas hifas. Estes escleródios foram tratados por 3 minutos em álcool 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio 50% e lavados duas vezes em água destilada. Após secarem sobre papel de filtro foram colocados em meio BDA e incubados em estufa BOD a 20° C. Após 7 dias o crescimento micelial radial foi mensurado em direções ortogonais. O teste foi feito em triplicata para cada concentração e escleródios formados em placas contendo meio BDA foram utilizados como controle do experimento.

3.2.5 Teste de suscetibilidade *in vitro*

A viabilidade celular do fungo *S. sclerotiorum* foi avaliada de acordo com o Protocolo Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Patente Nº 5,501,959. O fungo *S. sclerotiorum* isolado SPS foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA durante 3 dias a 20° C. Hifas jovens da borda da cultura foram crescidas em 125 µL de meio mínimo (MM) (2.0 g de Nitrato de Amônia, 1.0 g de Fosfato de Potássio, 0.1 g Sulfato de Magnésio, 0.5 g de Extrato de Levedura, 3.0 g de Ácido Málico e 1.0 g de Hidróxido de Sódio por litro de água destilada) suplementado com 0.1% de glicose e extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* com concentrações 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% (v/v) em microplacas de cultura celular com o fundo plano (NEST). As placas foram incubadas a 20° C por 24 horas. Após o tratamento adicionou-se a cultura 75 uL de tampão fosfato (400 mM pH 7.4) e 20 µL de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Catálogo DAL1025). As placas

foram incubadas no escuro à 37° C por 12 horas. Após este período 150 µL do sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova microplaca. As leituras de absorvância à 570 nm e 600 nm foram realizadas para determinar o percentual de redução do AB. Hifas não tratadas foram utilizadas como controle do experimento e o ensaio foi realizado em triplicata. A redução do alamar blue foi calculado através da equação fornecida pelo fabricante:

$$\text{Percentual de Redução do Alamar Blue} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

Onde:

λ_1 = comprimento de onda 570 nm,

λ_2 = comprimento de onda 600 nm,

$(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_1$ = coeficiente de extinção molar para forma oxidada do AB à 570 nm = 80,586

$(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_2$ = coeficiente de extinção molar para forma oxidada do AB à 600 nm = 117,216

$(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_1$ = coeficiente de extinção molar para forma reduzida do AB à 570 nm = 155,677

$(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_2$ = coeficiente de extinção molar para forma reduzida do AB à 600 nm = 14,652

$A \lambda_1$ = absorvância nos poços teste à 570 nm

$A \lambda_2$ = absorvância nos poços teste à 600 nm

$A' \lambda_1$ = absorvância do controle negativo à 570 nm

$A' \lambda_2$ = absorvância do controle negativo à 600 nm

3.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET foi realizada conforme descrito por Romagnoli et al. (2005), com algumas modificações. Discos de 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados em meio BDA enriquecido com 1.0% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*. Após 48 horas de crescimento discos do micélio tratado e do controle (micélio não tratado) foram fixados por um período de 10 horas à temperatura ambiente em 2.5% glutaraldeído e solução de ácido pícrico 0.2% em tampão Millonig's pH 7.3. As amostras foram lavadas duas vezes por 10 min no mesmo tampão e pós fixadas por 2 horas em tetróxido de ósmio 1.0% diluído em tampão Millonig's pH 7.3 e lavadas novamente no mesmo tampão por 5 min. As amostras foram desidratadas em uma série de

acetona graduada (30%, 50%, 70%, 95%, 95%, 15 minutos para cada diluição de acetona e três vezes em acetona a 100% por 10 min) e posteriormente incorporadas em resina araldite. Os blocos obtidos foram cortados com uma navalha de diamante em cortes ultrafinos de cerca de 60 nm. Estes cortes ultra finos foram contrastados com acetato de uranila 2.0% seguido por citrato de chumbo 2.0% por 10 minutos cada etapa. As amostras foram examinadas e as imagens digitais capturadas utilizando Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), Jeol, JEM-2100, equipado com EDS, Thermo scientific do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da UFG. O teste foi realizado em triplicata.

3.2.7 Indução em meio líquido para produção de enzimas de detoxificação

A indução em meio líquido foi realizada em MM suplementado com 1% parede celular de folhas de *P. vulgaris* (PC) como fonte de carbono. Para obtenção da parede celular folhas de feijoeiro comum foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e então homogeneizadas ao MM. Assim, quatro discos com 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de MM suplementado com a fonte de carbono. A cultura foi agitada a 120 rpm a 20 °C durante 48 h. Após este período de crescimento, as culturas foram filtradas em papel filtro para separação do micélio. O micélio foi lavado duas vezes com água destilada estéril e utilizado como inóculo em 25 mL de MM com 1.0% de PC e suplementado com 0.5% ou 1.0% de extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*. As culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm à 20 °C. Nos pontos de 12, 24 e 48 h as culturas foram filtradas através de papel filtro para retirada do micélio. O sobrenadante de cultura (filtrado) foi utilizado como extrato proteico bruto para a determinação de atividades de enzimas de detoxificação. As proteínas totais do extrato proteico bruto obtido foram quantificadas utilizando o Quant iT-Protein Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2.7.1 Atividade de Quercetinase

A atividade de quercetinase foi determinada a 25°C através da monitorização da queda no pico de absorvância a 367 nm devido à decomposição

de quercetina conforme descrito por Hund et al. (1999). A reação enzimática consistiu de 2.0 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM pH 6.0) contendo 20 µL de uma solução de estoque 10 mM de quercetina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, Catálogo Q4951) diluída em DMSO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) e 200 µL do extrato proteico bruto do sobrenadante de cultura. Uma unidade de quercetinase foi definida como a quantidade de enzima oxidante de 1 umol de quercetina por minuto. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.2.7.2 Atividade de Lacase

Atividade de lacase foi determinada de acordo com o método proposto por Leonowicz; Grzywnowicz (1981). O siringaldazina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, Catálogo S7896) foi utilizado como substrato. A oxidação do substrato ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi monitorizada através do aumento da absorvância a 525 nm durante 5 min. A reação enzimática consistiu de 1.0 mL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5.0) contendo 100 µL de uma solução de estoque de 1 mM siringaldazina diluída em etanol absoluto e 200 µL do extrato proteico bruto do sobrenadante de cultura, conduzida a 25 °C. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3 Efeitos do tratamento de extrato etanólico, flavonoides e óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* em plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas por *Sclerotinia sclerotiorum*

3.3.1 Material vegetal *Phaseolus vulgaris*

Plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Pérola (BRS) foram cultivadas em vasos de plástico de 5 kg contendo solo adubado com NPK (4-30-16), mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 20° C, fotoperíodo de 12 horas pelo período de 10 dias e irrigadas diariamente.

3.3.2 Teste de folha destacada

Folhas destacadas de plantas de feijoeiro crescidas conforme item 3.3.1 foram colocadas em placa de Petri com papel de filtro e água para manter a umidade. Estas folhas foram aspergidas com extrato etanólico, óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, quercetina ou rutina, respectivamente. Os tratamentos com o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* foram realizados nas concentrações finais de 0.05, 0.1 e 0.2% (v/v), com a quercetina e rutina com 0.25, 0.5 e 1.0 mg/L e com o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* com 25, 50, 100 e 200 ppm preparadas em 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) sendo o volume final ajustado para 500 µL com água destilada. As folhas foram tratadas por asperção com o volume final de 500 µL por folha. As placas com as folhas tratadas foram incubadas em câmara de germinação a 20° C por 24 horas com fotoperíodo de 12 horas. Após este período, discos com 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados nas folhas destacadas e as placas foram incubadas em igual condição. A formação da área de lesão foi mensurada com auxílio de um paquímetro digital com 12, 24 e 48 hai. O grupo controle foi composto por folhas tratadas com uma solução de 500 µL/folha contendo 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) e 400 µL de água e inoculadas com o fungo. Os testes foram feitos em triplicatas para cada concentração dos compostos testados e o percentual de inibição foi calculado em relação às folhas destacadas que não receberam tratamento.

3.3.3 Tratamento e inoculação de Plantas de Feijoeiro Comum para análise macroscópica, bioquímica e molecular

Plantas de feijoeiro crescidas conforme item 3.3.1 foram tratadas com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (0.2% v/v), quercetina (1.0 mg/L) rutina (1.0 mg/L) ou óleo essencial de folhas de *E. uniflora* (200 ppm) preparadas em 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) sendo o volume final ajustado para 500 µL com água destilada. O tratamento foi realizado por aspersão de 500 µL por folha até o gotejamento. Estas plantas tratadas foram mantidas a 20° C e 90% de umidade relativa por 24 horas com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de tratamento, discos com 7 mm de diâmetro da cultura do fungo crescido em meio BDA por 4 dias foram inoculados na porção adaxial de folhas. As plantas foram mantidas a 20° C com fotoperíodo de 12 horas. As áreas de lesões foram

mensuradas com 12, 24 e 48 hai. O grupo controle foi composto por plantas sadias tratadas e plantas sadias sem tratamento inoculadas com discos de ágar estéril. Para análise bioquímica e molecular as folhas foram coletadas em 0, 12, 24 e 48 hai e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para extração de proteínas totais e RNA. Os testes foram feitos em triplicata, no qual cada tratamento teve um conjunto de três plantas e cada ponto de análise (12, 24 e 48 hai) para cada tratamento teve um conjunto de três plantas.

3.3.4 Atividades Enzimáticas

Para a extração de proteínas um pool de folhas de um conjunto de três plantas tratadas e inoculadas conforme o item 3.3.1 foram utilizadas para análise. A quantidade de 0.5 g das amostras de folhas de feijoeiro comum foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e homogeneizadas em 1 mL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5.0). O homogenato foi centrifugado a 4.500 g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi considerado o extrato bruto para a determinação de atividades enzimáticas de resposta de defesa da planta. As proteínas totais do extrato proteico bruto obtido foram quantificadas utilizando o Quant iT-Protein Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.3.4.1 Atividade de Peroxidases

A atividade das peroxidases foi determinada por espectrofotometria direta a 470 nm pela mensuração da conversão de guaiacol em tetraguaiacol (Lusso; Pascholati 1999). A reação consistiu de 2.9 mL de uma solução contendo 250 µL de guaiacol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato (100 mM pH 6.0) e 100 µL do extrato proteico bruto. O branco da reação continha 3 mL de uma solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato (100 mM pH 6.0). Os testes foram feitos em triplicata. A atividade das peroxidases foi definida como um aumento de 0,1 unidades de absorvância por minuto. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3.4.2 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A atividade de PAL foi mensurada pela produção de ácido trans-cinâmico a partir de L-fenilalanina como substrato, conforme descrito por Zucker (1969). A reação consistiu de 100 µL do extrato proteico bruto, 400 µL de 50 mM de L-fenilalanina em tampão tris-HCl (25 mM pH 8.8) e 500 µL de tampão tris-HCl (25 mM pH 8.8) que foi incubada durante 2 horas a 40° C. A quantidade de ácido trans-cinâmico produzida foi determinada por leitura de absorvância a 290 nm. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade da PAL foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na absorção a 290 nm de 0,01 por hora do ensaio padrão. Esta mudança é equivalente a formação de 1 µg de ácido trans-cinâmico por mL de mistura de reação. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3.4.3 Atividade de β -1,3- Glucanase

A atividade de β -1,3- glucanase foi mensurada através da formação de glicose a partir de laminarina como substrato, como descrito por Boller (1992). A reação consistiu de 50 µL do extrato proteico bruto, 100 µL de 0,25% de laminarina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão acetato de sódio (100 mM pH 5.0) que foi incubada por 30 minutos a 40° C. A reação foi parada pela adição de 750 µL de ácido dinitrossalicílico (DNS) e fervida durante 5 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550 nm pelo método de DNS (Miller 1959), utilizando glicose como padrão. Os testes foram feitos em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3.4.4 Quitinases

A atividade de quitinases foi mensurada através da formação de glicose a partir da Quitina coloidal (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, catálogo C-7170) como substrato. A reação consistiu de 50 µL do extrato proteico bruto, 50 µL de 1.0% de

Quitina coloidal dissolvida em tampão acetato de sódio (100 mM pH 5.0), e foi incubada a 40° C durante 60 minutos. A reação foi parada pela adição de 1.0 mL de DNS e fervida durante 5 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550 nm pelo método de DNS (Miller 1959), utilizando glicose como padrão. Os testes foram feitos em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3.4.5 Polifenoloxidasas

Atividade das polifenoloxidasas foi determinada de acordo com o método proposto por Duangmal; Owusu Apenten (1999). O pirocatecol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA, Catálogo C9510) foi utilizado como substrato. A atividade de polifenoloxidasas foi monitorada a 420 nm devido à conversão do pirocatecol em quinona a 30° C. A reação consistiu de 900 µL uma solução contendo 20 mM de pirocatecol dissolvido em tampão fosfato de sódio (100 mM pH 6.8) e 200 µL do extrato bruto do sobrenadante de cultura. Os testes foram feitos em triplicata. A atividade de polifenoloxidasas foi definida como um aumento de 0,1 unidades de absorvância por minuto. Os resultados foram expressos como atividade específica em unidade enzimática (U.E.)/min/mg de proteína.

3.3.5 Isolamento de RNA total e PCR em tempo real (qPCR)

Para a extração de RNA um conjunto de folhas coletadas de três plantas tratadas e inoculadas conforme o item 3.3.1 foram utilizadas para análise. O RNA foi extraído, utilizando o protocolo padrão de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O RNA foi tratado DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para eliminar traços de DNA genômico, seguido de inativação da enzima (EDTA 2,5 mM, 65°C / 10 min) e precipitação com etanol absoluto. O RNA total foi quantificado utilizando o ensaio colorimétrico Qubit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) e a verificação da qualidade foi feita utilizando eletroforese em gel de agarose 0.8% contendo brometo de etídeo (EtBr).

O sistema RT-qPCR com detecção pelo SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado para analisar a expressão de genes de interesse. A quantidade de 1 µg RNA foi submetida a reação de transcriptase reversa (Superscript III – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) usando o iniciador oligo(dT)₁₂₋₁₈ e posteriormente submetidos a PCR em tempo real. Os ensaios de amplificação foram realizados com StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10 µL de reação continha 0.4 µM de cada iniciador, 6 µL de SYBR Green PCR Master mix (2x), e 0.2 µL do cDNA obtido. A reação de amplificação teve os seguintes parâmetros, desnaturação inicial a 95° C por 10 min, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos por 1 minuto a 60° C. A expressão do gene foi obtida conforme proposto por Livak; Schmittgen (2001). Os iniciadores foram desenhados no *software* PRIMER 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) utilizando como parâmetros: temperatura de desnaturação do iniciador entre 57 – 63 °C, tamanho do iniciador entre 18 e 22 pares de bases (pb) nitrogenadas e o produto da amplificação da reação entre 100-200 pb. O gene Actina 11 (*P. vulgaris*) foi utilizado como gene referência do experimento (Borges et al. 2012). A tabela 02 descreve os iniciadores utilizados para análise dos genes de interesse.

3.4 Análise Estatística

Para todos os experimentos, os dados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT (2010) versão 7.6 beta.

Tabela 2 – Sequências de iniciadores utilizados no RT-qPCR.

	Descrição do gene	Iniciadores <i>Forward/Reverse</i> (5'-3')
<i>PvPR1</i>	Proteína Relacionada à patogênese PR-1	F: AAAGCCAAGAGCGATTCTCTTTTCA R: GAACACTCTGATTTGATAAACTTC
<i>PvPR2</i>	β -1,3- glucanase	F: GAAGATGAGCtCAAAGCTGGTAA R: CAAGGATTGGCCAAAAGGTA
<i>PvCHIT</i>	Quitinase classe 1	F: ATTGTTGTGCCAATCCCTTT R: CACCGCCATACAGTTCAAAA
<i>PvPAL</i>	Fenilalanina amônia-liase	F: GACACACAAGTTGAAGCACCA R: TGCAGCTTCTTAGCATCCTTC
<i>PvLOX</i>	Lipoxigenase	F: AGCACTGTGCCTGTTTTTCAGT R: AACACACGAGAAGATTCAACCA
<i>PvDOX</i>	α -dioxigenase	F: CACAAATCCTCCCAAATGG R: AAAGGTTACACCATTGATTGG
<i>PvFPS1</i>	Farnesil pirofosfato sintase 1	F: CGGAATAGACGTTGAGGAATG R: AACACCTACCCGAATTTCTGC
<i>PvACT11</i>	Actina 11	F: TGCATACGTTGGTGATGAGG R: AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CAPÍTULO 01 - Extrato etanólico e flavonoides de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos sobre o mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).

4.1.1 Resultados

4.1.1.1 Capacidade inibitória mínima (MIC)

O extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* foi utilizado para avaliar a atividade antifúngica sobre o *S. sclerotiorum*. Os dados obtidos mostram que a inibição do crescimento foi positivamente correlacionada com o aumento da concentração do extrato etanólico e esta relação foi ajustada ao modelo linear de regressão para os pontos avaliados, 24, 48 e 72 hai (Figura 6).

A concentração inibitória mínima para o *S. sclerotiorum* foi de 0.6% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, com redução do crescimento micelial radial de 8% em relação ao controle. Nas concentrações a partir de 1.0% (v/v) do extrato etanólico a inibição micelial foi superior a 40% com 24 e 48 hai (Figura 6).

4.1.1.2 Efeito do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* sobre a viabilidade celular do *Sclerotinia sclerotiorum*

Para avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* sob a viabilidade celular de hifas do *S. sclerotiorum* foi realizado o teste do Alamar blue conforme descrito no item 3.2.5 (Figura 7). Este teste é caracterizado pela presença de um indicador colorimétrico que durante o crescimento contínuo de células o indicador converte da coloração azul para rósea, permitindo assim determinar a morte celular causada por um agente químico.

Os dados de viabilidade celular mostram que a relação entre o percentual de inibição de crescimento celular e as concentrações do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* testadas foi dose dependente, sendo esta relação ajustada ao modelo linear de regressão. Neste teste o IC50 para o *S. sclerotiorum* foi de 0.6% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (Figura 7A).

Os dados mostram que no teste de crescimento micelial radial em placa de Petri a inibição do crescimento foi positivamente correlacionada com o aumento das concentrações do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (Figura 7B) utilizados para o teste de viabilidade celular, confirmando os resultados anteriormente obtidos (Figura 6) e indicando a complementariedade dos testes utilizados.

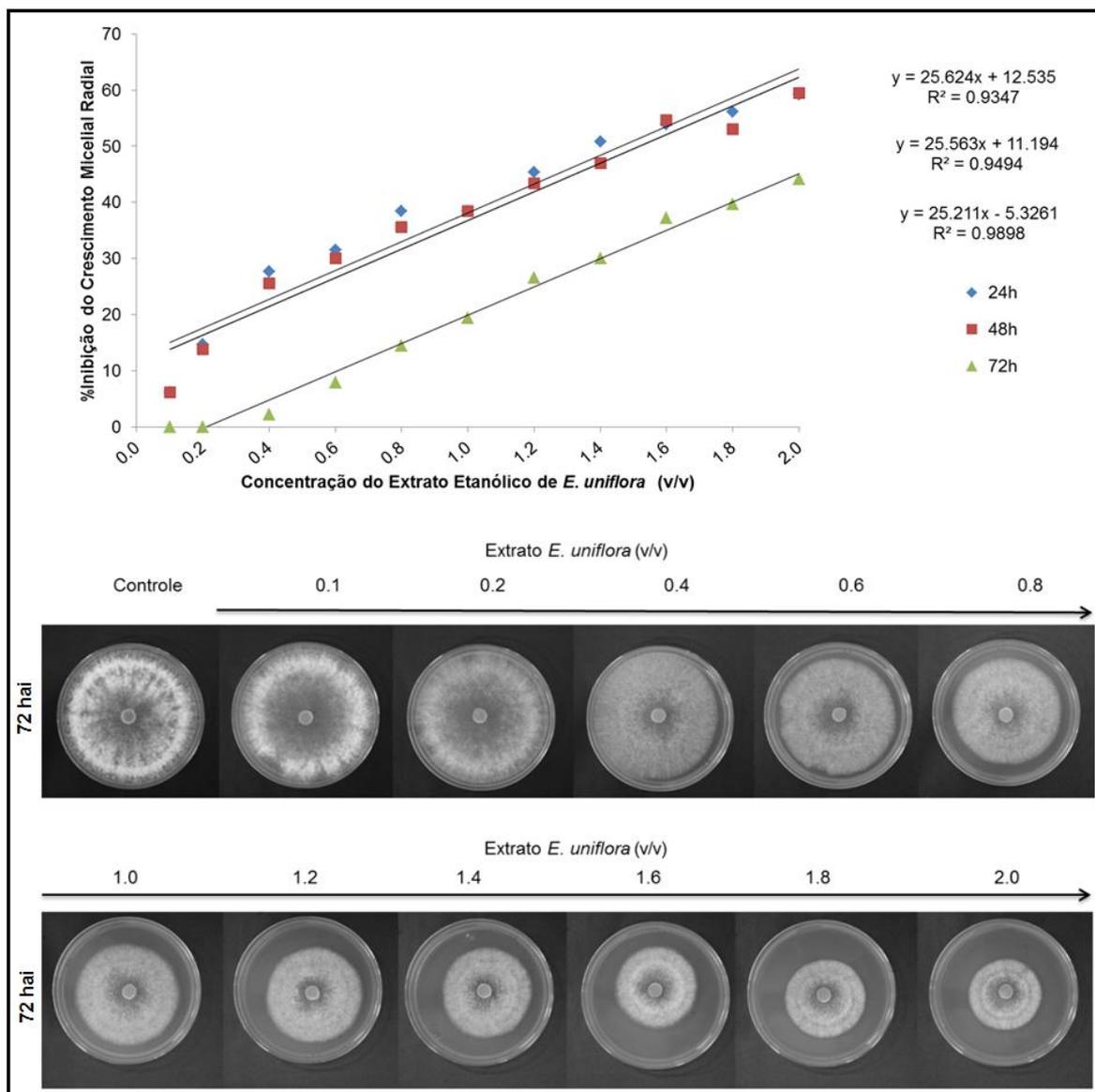


Figura 6 – Efeito do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o crescimento radial do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. O percentual de inibição do crescimento micelial em concentrações crescentes de extrato etanólico em meio BDA foi avaliado nos pontos de 24, 48 e 72 horas após inoculação em relação ao controle do experimento.

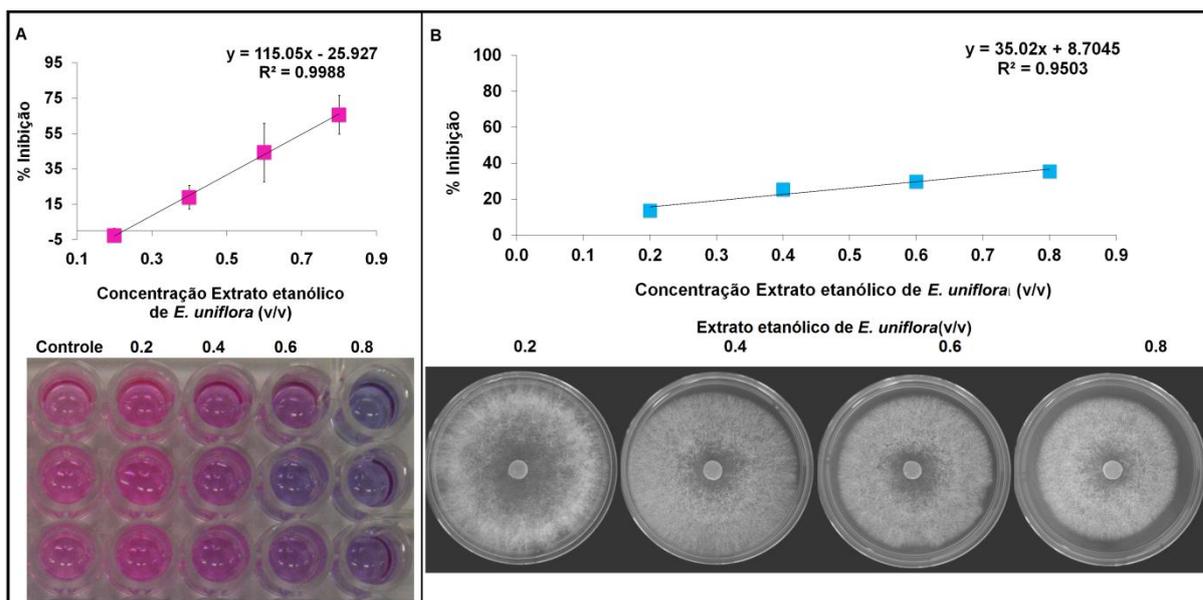


Figura 7 – Efeito do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* sobre a viabilidade celular do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. (A) Percentual de inibição do crescimento micelial em concentrações crescentes de extrato etanólico em meio mínimo pelo método do Alamar Blue. (B) Percentual de inibição do crescimento radial do micélio em concentrações crescentes de extrato etanólico em meio BDA.

4.1.1.3 Efeito do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* e dos flavonoides, quercetina e rutina sobre o crescimento micelial do *Sclerotinia sclerotiorum* e desenvolvimento de escleródios

Baseado na descrição dos principais compostos presentes no extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* realizada no trabalho de Fiuza et al. (2008), foram selecionados dois flavonoides, quercetina e rutina para o teste. O crescimento do *S. sclerotiorum* foi avaliado, nos pontos de 12, 24, 48 e 72 hai, em meio BDA suplementado com 1.25, 2.50 e 5.0 mg/L de quercetina ou rutina (Figura 8). O fungicida comercial fluazinam foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0.1, 1.0 e 10.0 ppm. O fluazinam é um fungicida de ação protetora com pouca atividade sistêmica ou curativa. Seu modo de ação é através da inibição da respiração celular interrompendo a fosforilação oxidativa (Guo 1991).

Os dados mostram que o aumento da concentração do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, e da quercetina ou rutina correlacionou-se significativamente ($p < 0,01$) com a inibição do crescimento micelial radial. Para rutina e quercetina a concentração de 5 mg/L foi responsável por uma inibição de 16 e 12%,

respectivamente, com 48 hai (Figura 8). Dentre os produtos testados o extrato etanólico apresentou maior inibição do crescimento micelial, 40% na concentração de 1% (v/v). Para o Fluazinam foi observado inibição de 100% do crescimento micelial radial nas concentrações de 1.0 e 10.0 ppm (Figura 8).

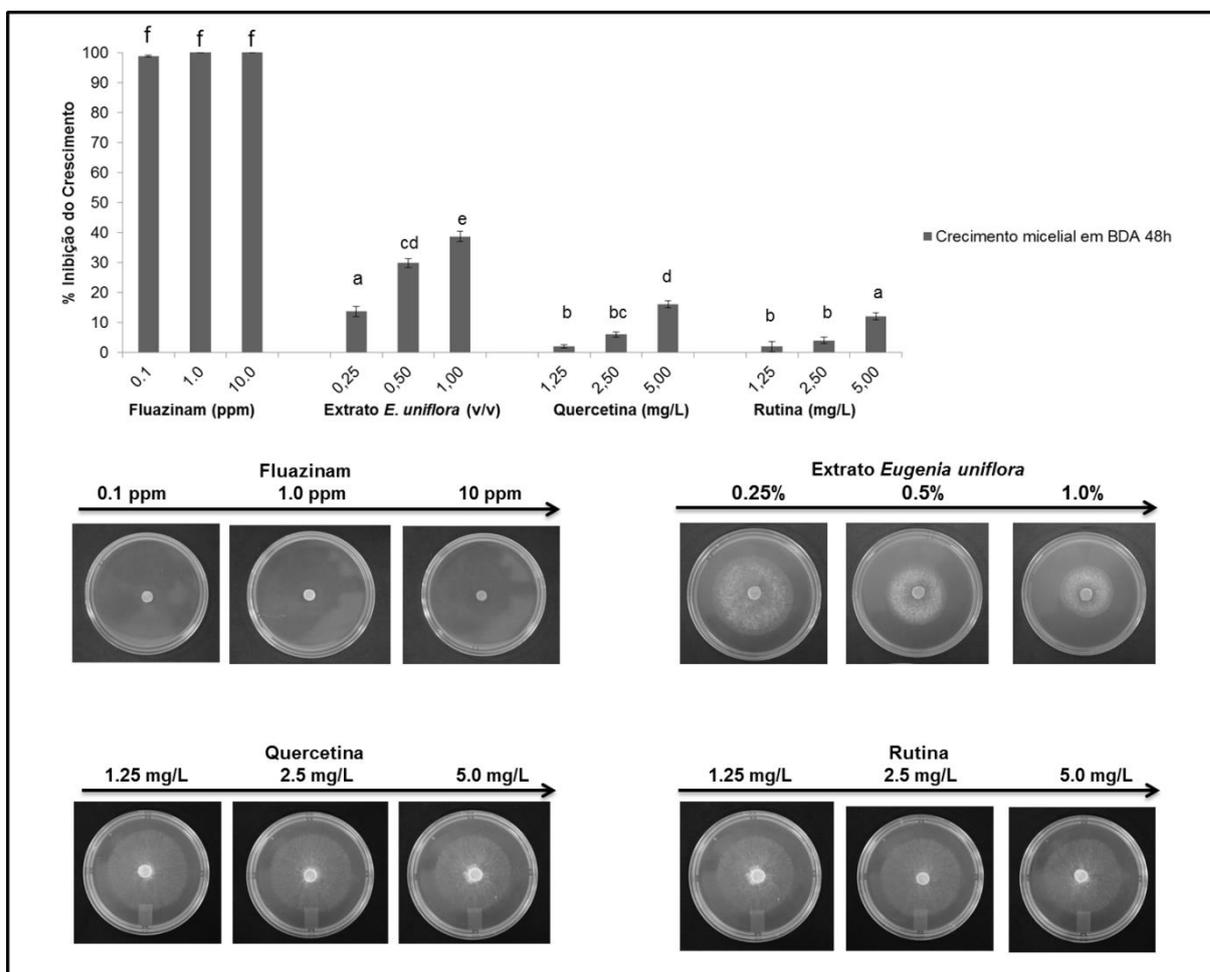


Figura 8 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* e dos flavonoides, quercetina e rutina sobre o crescimento radial do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. O percentual de inibição do crescimento micelial nas concentrações 0.1, 1.0 e 10.0 ppm do fluazinam, 0.25, 0.5 e 1.0% (v/v) de extrato etanólico, 1.25, 2.50 e 5.0 mg/L de quercetina ou rutina, respectivamente em meio BDA foi avaliado nos pontos de 48 horas após inoculação em relação ao controle do experimento. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Após o teste de crescimento micelial, o efeito do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (1.0% v/v), quercetina (5 mg/L) e rutina (5 mg/L) sobre o

desenvolvimento de escleródios de *S. sclerotiorum* foi avaliado (Figura 9). Foi observado que em placas controle (sem compostos) a formação de escleródios ocorreu 7 dias após inoculação e em placas suplementadas com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (0.25% v/v), esta formação foi observada somente 12 dias após inoculação, caracterizando assim um retardo de 5 dias de desenvolvimento dos escleródios. Em placas suplementadas com quercetina e rutina não foi observado atraso na formação dos escleródios comparado ao controle.

Os escleródios formados em placas nos diferentes tratamentos foram quantificados, mensurados e pesados 15 dias após inoculação. Foi observado que em todos os tratamentos houve desenvolvimento de um número superior de escleródios, porém os mesmos apresentaram tamanho e peso inferior ao controle (Figura 9).

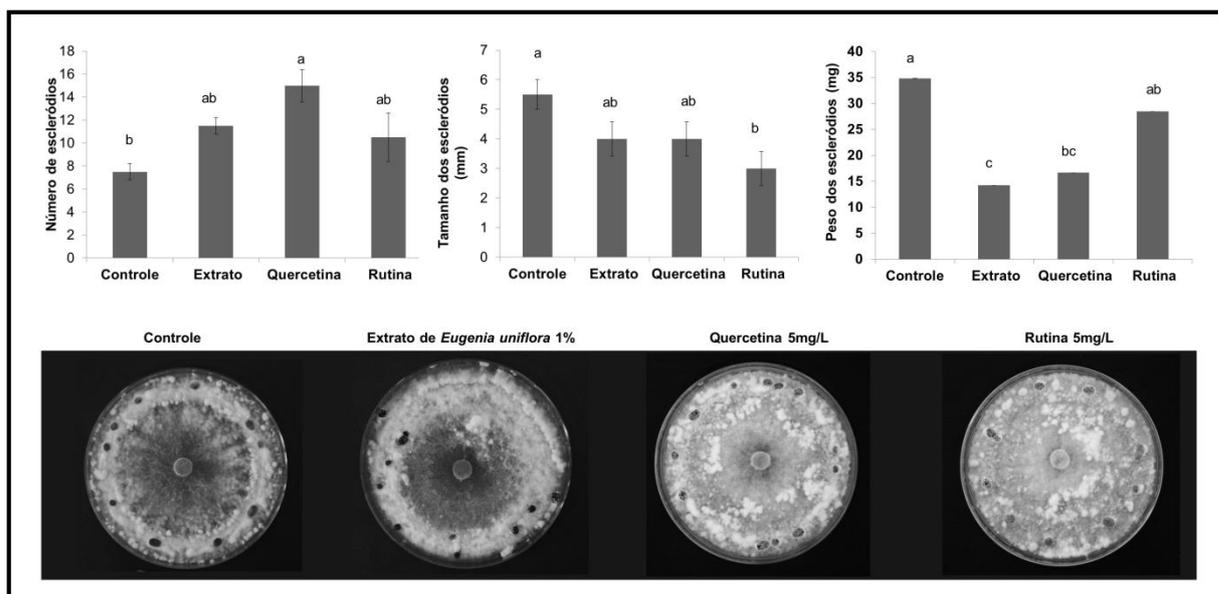


Figura 9 – Desenvolvimento *in vitro* de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* formados em meio BDA suplementado com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*, quercetina e rutina. O efeito de 1.0% (v/v) de extrato etanólico, 5.0 mg/L de quercetina e 5.0 mg/L de rutina em meio BDA foi avaliado 15 dias após inoculação para formação de escleródios. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.1.1.4 Efeito do extrato etanólico e dos Flavonoides de *Eugenia uniflora* sobre a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*

Os escleródios de *S. sclerotiorum* formados em placas suplementadas com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* (1.0% v/v), quercetina (5 mg/L) e rutina (5 mg/L) foram avaliados quanto a viabilidade. Tais escleródios foram desinfectados e plaqueados em meio BDA e o micélio desenvolvido foi mensurado (Figura 10).

Os escleródios formados sob tratamento de 1.0% (v/v) do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* apresentaram viabilidade similar ao do controle. Por outro lado, os escleródios formados sobre tratamento de 5 mg/L de rutina ou quercetina não apresentaram crescimento micelial 7 dai (Figura 10).

4.1.1.5 Efeito do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* sobre a morfologia celular de hifas do *S. sclerotiorum*

A morfologia celular de hifas do *S. sclerotiorum* foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 11). Ultra-estruturalmente, as células das hifas cultivadas em meio BDA controle (sem tratamento) apresentam um formato linear observado nos cortes transversais e longitudinais da célula (Figura 11A e C), septos evidentes (Figura 11A e E), um citoplasma elétron-denso, rico em mitocôndrias distribuídas pelo citoplasma e apresentando dimensões e formato regular, vacúolos nítidos posicionados abaixo da membrana plasmática (Figura 11C e G), poucos peroxissomos evidentes (Figura 11E), membrana plasmática bem definida (Figura 11A e G) e parede celular (quitina) elétron-transparente (Figura 11G).

Foi observado que hifas cultivadas em meio BDA suplementado com extrato etanólico de *Eugenia uniflora* apresentaram alterações marcantes em sua morfologia em comparação as hifas controle (Figura 11B, D, F e H). A alteração mais evidenter do citoplasma foi referente aos vacúolos, os quais apresentam aumento de dimensão visível ao corte transversal (Figura 11B), bem como aumento na quantidade destes vacúolos observados ao corte longitudinal da célula (Figura 11B). O citoplasma mostrou elevado número de peroxissomos e mitocôndrias (Figura 11F e H). Na figura 11H foi possível observar um produto de excreção elétron-denso sendo englobado por um vacúolo, não sendo isto observado no controle do experimento.

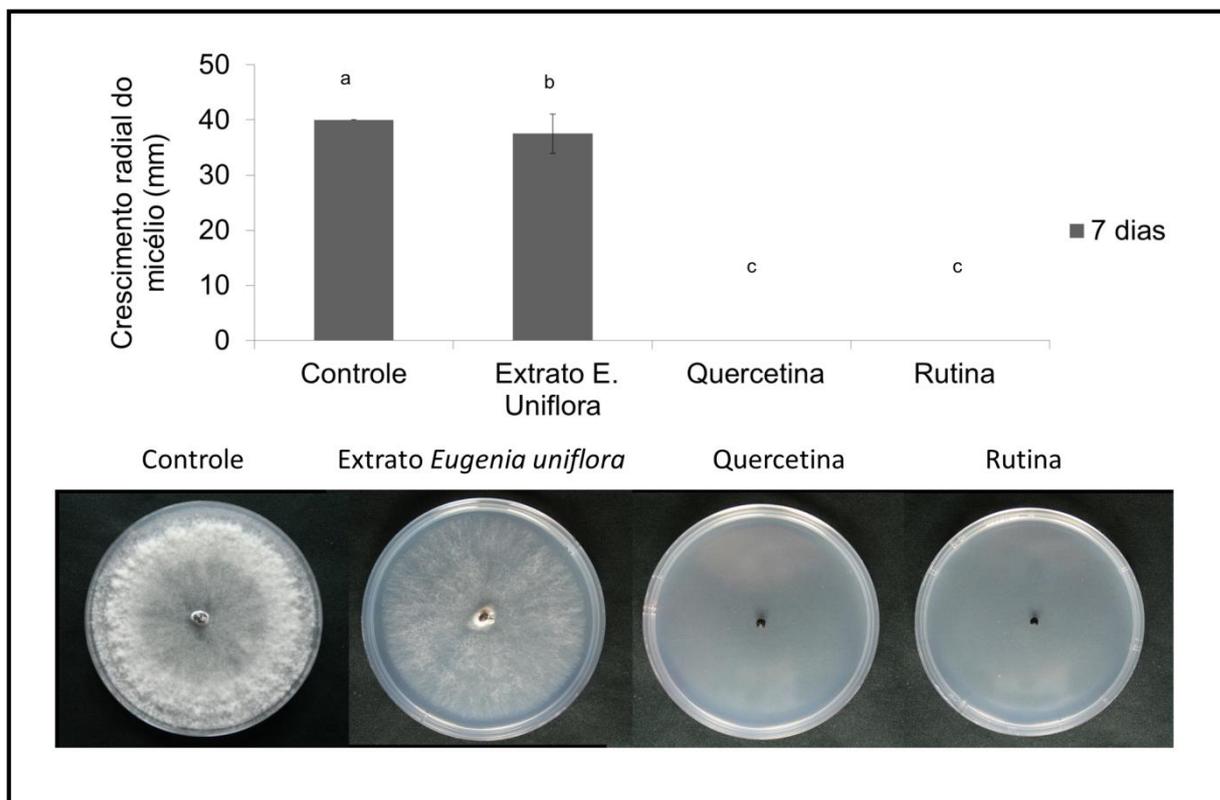


Figura 10 - Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* desenvolvidos em meio BDA suplementado com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*, quercetina e rutina. O crescimento micelial a partir de escleródios que foram formados em meio BDA suplementado com 1.0% (v/v) de extrato etanólico, 5.0 mg/L de quercetina e 5.0 mg/L de rutina foi avaliado 7 dias após inoculação. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

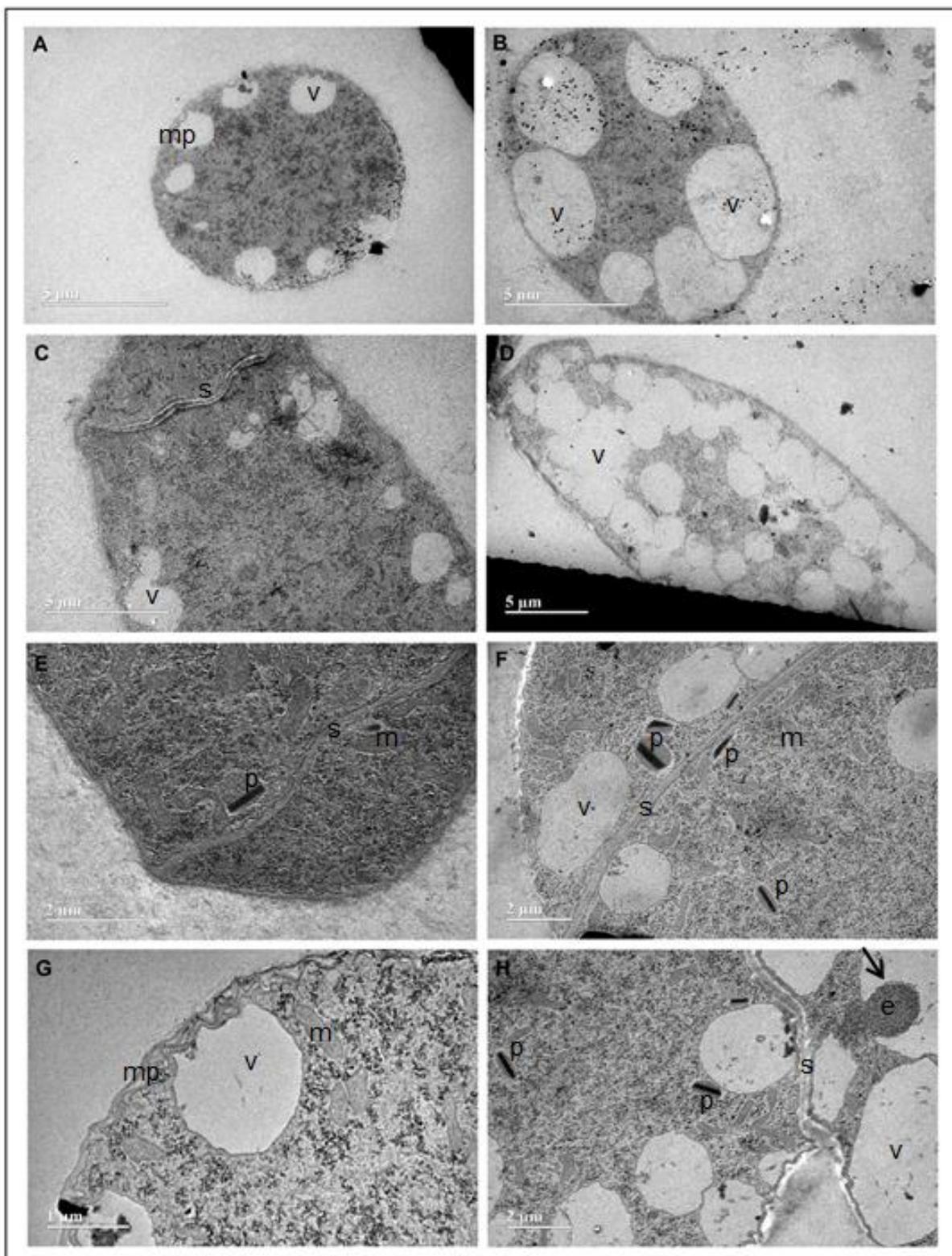


Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum*. (A, C E e G) Hifas saudáveis crescidas sobre meio BDA (controle). (B, D, F e H) Efeito de 1.0% v/v do extrato etanólico sobre a morfologia celular de hifas. e: produto de excreção; mp: membrana plasmática e parede celular; m: mitocôndria; p: peroxissomo; s: septo; v: vacúolo.

4.1.1.6 Enzimas de detoxificação produzidas pelo *S. sclerotiorum*

O efeito dos compostos bioativos presentes no extrato de *E. uniflora* sobre os níveis de atividade de enzimas de detoxificação, lacase e quercetinase, produzidas pelo fungo *S. sclerotiorum* foi avaliado durante uma cinética de indução em meio líquido (Figura 12 e 13). Os dados mostram baixa produção de quercetinase durante a indução (12, 24 e 48 hai) em meio líquido suplementado com parede celular de folhas de *P. vulgaris*, como fonte de carbono. No entanto, quando acrescido o extrato etanólico (1% v/v) foi observado altos níveis de produção de quercetinase, apresentando um pico de atividade de 48 hai (Figura 12).

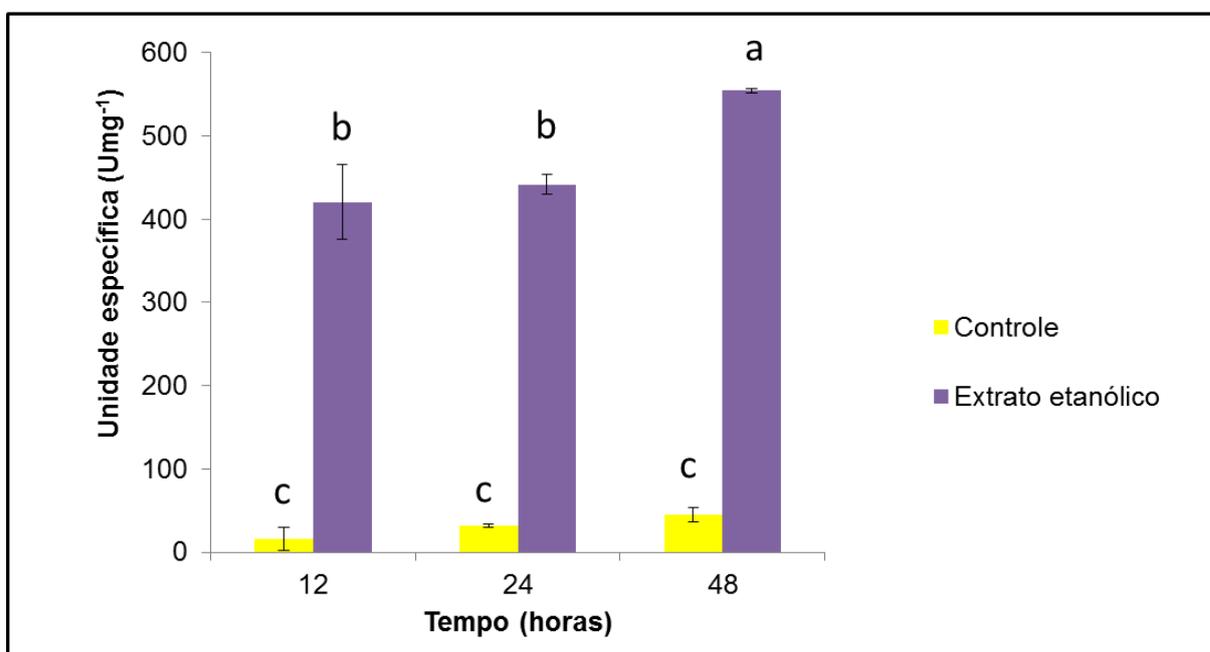


Figura 12 – Nível de atividade de quercetinase no sobrenadante de cultura de *Sclerotinia sclerotiorum*. A cinética de indução do crescimento do fungo foi realizada com meio mínimo (controle) e em meio mínimo suplementado com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* ambos acrescidos com parede celular de folhas de *P. vulgaris*. A mensuração de quercetinase foi realizada com 12, 24 e 48 horas após inoculação. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Já para a atividade de lacase os dados mostram que na indução controle houve alta atividade de lacase no período inicial (12hai) seguido por um decréscimo de atividade no decorrer da cinética. Por outro lado, na presença do extrato etanólico

de *E. uniflora* (1% v/v) houve menor produção de lacase nos períodos iniciais seguido por um aumento significativo no período final de indução, indicando que o extrato etanólico interfere no potencial de detoxificação fúngica através da produção de lacase (Figura 13).

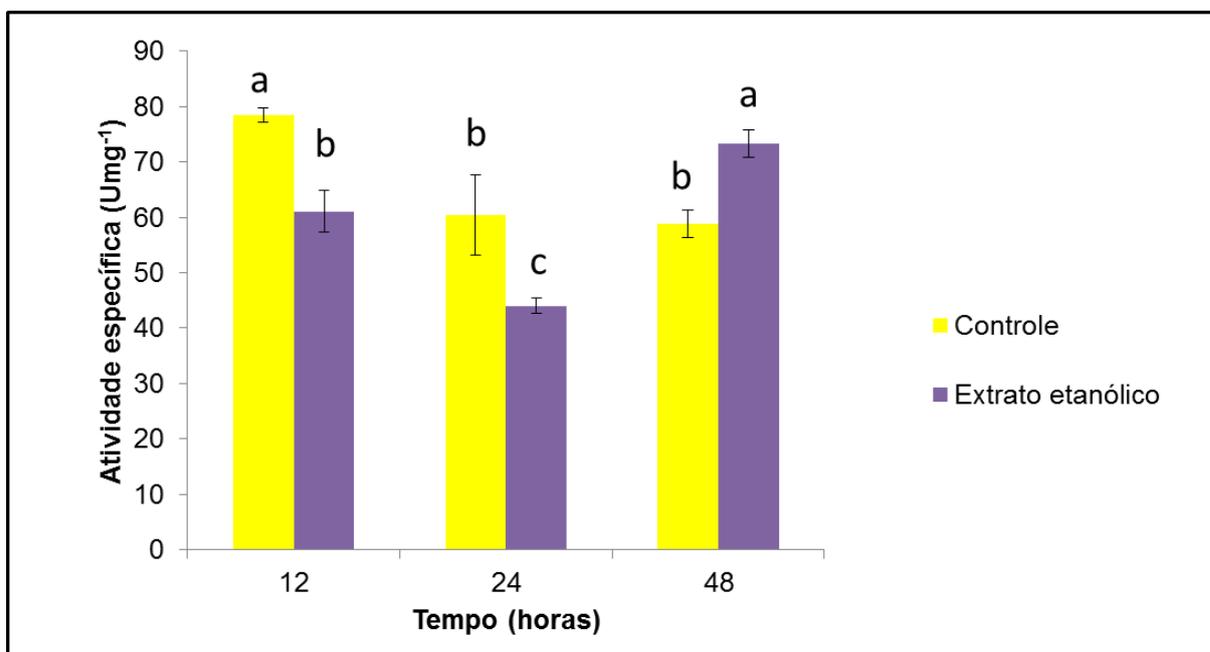


Figura 13 – Nível de atividade de lacase no sobrenadante de cultura de *Sclerotinia sclerotiorum*. A cinética de indução do crescimento do fungo foi realizada com meio mínimo (controle) e em meio mínimo suplementado com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* ambos acrescidos com parede celular de folhas de feijoeiro comum. A mensuração de lacase foi realizada com 12, 24 e 48 horas após inoculação. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.1.1.7 Efeito do extrato etanólico e dos flavonoides de *Eugenia uniflora* sobre a incidência da doença mofo branco em plantas de feijoeiro comum

4.1.1.7.1 Teste de folha destacada

O extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, quercetina e rutina foram testados como reguladores do desenvolvimento de mofo branco em plantas de feijoeiro. As folhas destacadas de plantas de feijoeiro foram tratadas com os

respectivos compostos e após 24 horas inoculadas com o *S. sclerotiorum*. O desenvolvimento da doença foi mensurado pela área de lesão formada com 48 hai (Figura 14). Os dados mostram que as folhas previamente tratadas com extrato etanólico de *E. uniflora* não desenvolveram manchas necróticas visíveis durante o estágio inicial de infecção em comparação com as folhas controle não tratadas (Figura 14A).

As folhas tratadas com quercetina não apresentaram um padrão de diminuição de área de lesão com o aumento das concentrações de tratamento, pelo contrário, no tratamento realizado com 0.5 mg/L de quercetina foi observado maior área necrótica que o controle (Figura 14B). Já o tratamento com rutina nas concentrações 0.5 e 1.0 mg/L demonstrou efetiva inibição da infecção, não sendo observada a formação de áreas de necrose com 48 hai (Figura 14C).

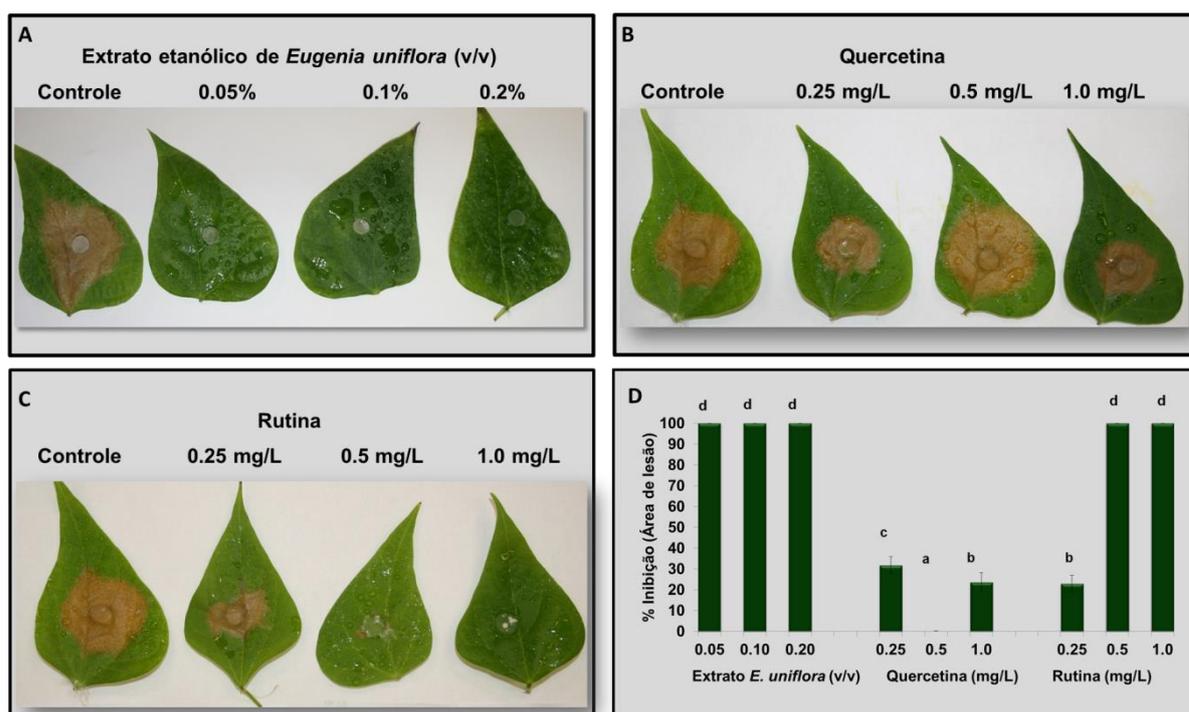


Figura 14 - Desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de feijoeiro comum previamente tratadas com concentrações crescentes de extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*, de quercetina e de rutina. A área de lesão formada nas folhas foi mensurada após 48 horas de inoculação do fungo. O percentual de inibição da lesão foi avaliado em relação as folhas destacadas controle (sem tratamento). As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Corroborando com estes dados de folha destacada, a análise do perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* obtido no presente estudo confirmou a presença do flavonoide rutina com o teor de 0.25% (Figura 15).

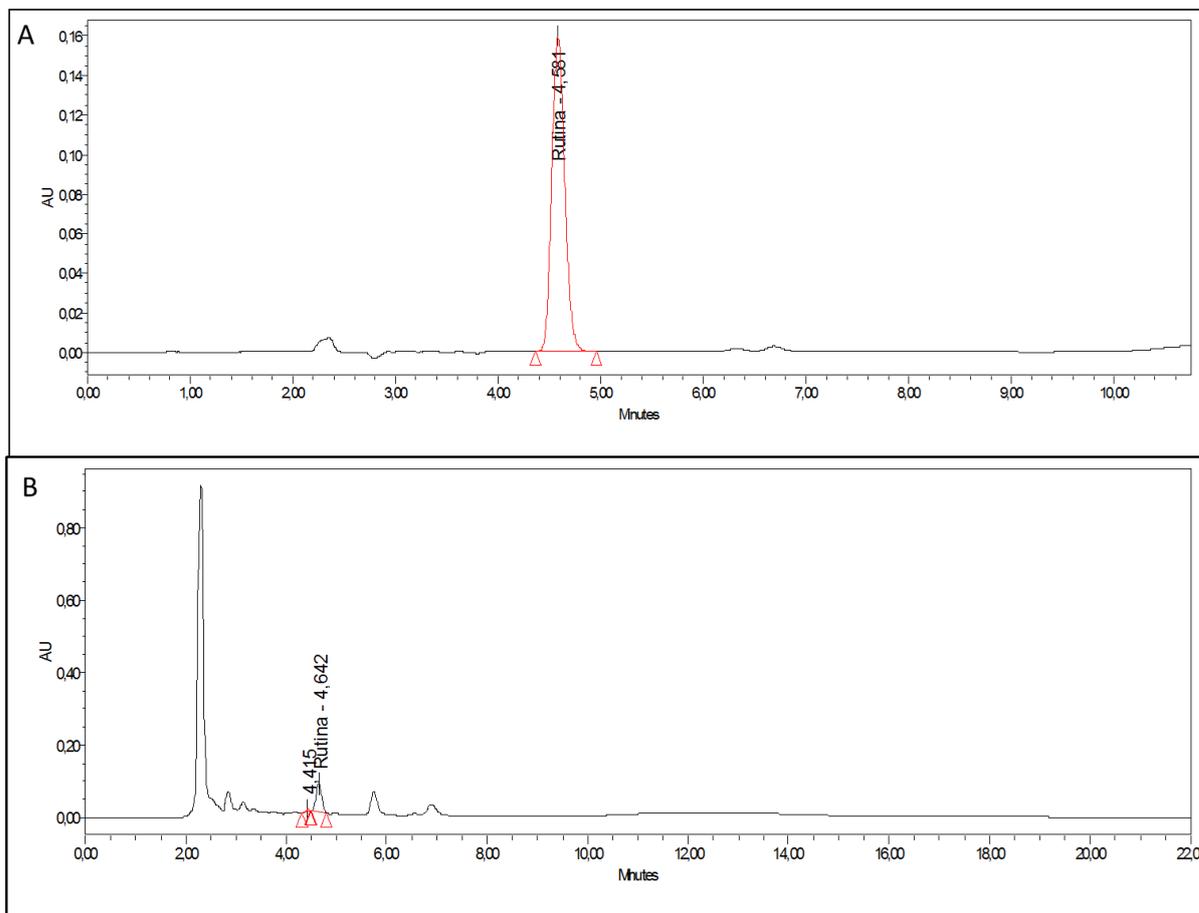


Figura 15 – Identificação do teor de rutina presente no extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*. (A) Perfil cromatográfico do padrão de rutina. (B) Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*.

4.1.1.7.2 Lesão macroscópica *In vivo*

A resposta das plantas de feijoeiro frente ao tratamento com o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, de Quercetina e de Rutina foi avaliada pelo desenvolvimento da área de lesão nas folhas, aspectos bioquímicos e moleculares. A formação da área de lesão em plantas de feijoeiro pode ser observada na figura 16. A figura mostra que as plantas inoculadas apresentaram alta infecção pelo fungo *S. sclerotiorum* com 48 hai (Figura 16A), enquanto as plantas previamente tratadas

com extrato etanólico e após 24 horas inoculadas com o fungo apresentaram menor área de lesão (Figura 16B).

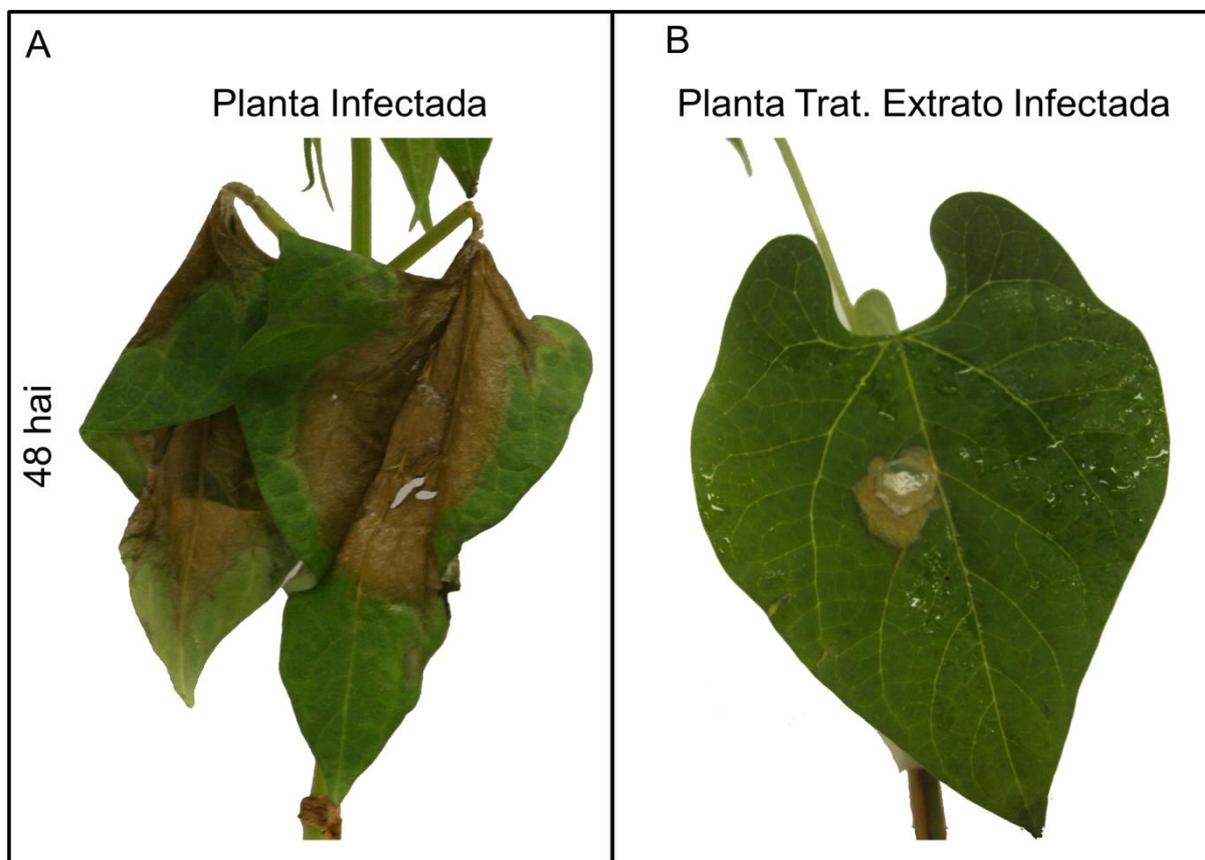


Figura 16 - Desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*. A área de lesão formada foi avaliada com 48 horas após inoculação do fungo. (A) Planta controle infectada. (B) Planta tratada com 0.2 % (v/v) de extrato etanólico e após 24 horas de tratamento inoculadas com o fungo.

4.1.1.7.3 Análise bioquímica

Para avaliar os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa da planta, induzida pelos diferentes tratamentos, a atividade de proteínas relacionadas a defesa da planta, como as peroxidases, quitinases, β -1,3- glucanase, PAL e polifenoloxidasas, foram mensuradas (Figura 17).

O efeito dos tratamentos como elicitador de resposta foi avaliado em plantas de feijoeiro sadias. As plantas sadias tratadas apresentaram alterações significativas ($p < 0,01$) nos níveis das atividades analisadas quando comparada às plantas sadias

sem tratamento (Figura 17A). As atividades da β -1,3- glucanase e PAL apresentaram o mesmo padrão de cinética enzimática. O tratamento com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* e rutina demonstram uma indução inicial destas enzimas no ponto de 12 hat (horas após tratamento), porém o pico máximo de atividade foi em 24 hat. Em contraste as plantas tratadas com quercetina apresentaram atividades de β -1,3- glucanase e PAL inferior aos outros tratamentos durante todos os pontos avaliados (Figura 17A).

Para a atividade de quitinases os tratamentos com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* e rutina induziram um pico inicial em 12 horas após tratamento, em contraste com o tratamento com quercetina que apresentou um pico em 24 hat (Figura 17A). As plantas tratadas com extrato etanólico apresentaram indução inicial e estatisticamente significativa, com 12 hat para as atividades de peroxidases e polifenoloxidasas. O decréscimo de peroxidases e polifenoloxidasas durante a cinética de tratamento com extrato etanólico foi contínuo até o ponto de 48 hat (Figura 17A). Já plantas tratadas com rutina apresentaram máximo de atividade de peroxidases com 24 hat e para atividade de polifenoloxidasas se manteve constante durante a cinética de tratamento. Para o tratamento com quercetina o nível de peroxidases não foi significativo e o nível de polifenoloxidasas foi constante. Estes resultados indicam que os tratamentos com o extrato etanólico e as frações flavonoides, sem a presença do fungo, interferem diretamente na indução de resposta através de proteínas relacionadas a defesa da planta (Figura 17A).

O efeito dos tratamentos em plantas de feijoeiro foi avaliado em uma cinética de infecção pelo fungo *S. sclerotiorum* foi analisado. A análise das enzimas, peroxidases, quitinases, β -1,3- glucanase, PAL e polifenoloxidasas para plantas tratadas e após 24 horas inoculadas também apresentaram resposta significativa (Figura 17B). As atividades da β -1,3- glucanase e PAL apresentaram o mesmo padrão de cinética enzimática observado anteriormente em plantas que receberam somente o tratamento e não a inoculação. O tratamento com extrato etanólico induziu, no ponto inicial 12 horas após inoculação, um pico de β -1,3- glucanase e PAL que se mantiveram durante todo o processo de infecção (Figura 17B). O tratamento de rutina também apresentou uma resposta positiva para estas enzimas analisadas, com indução máxima com 24 hai. O tratamento com quercetina não apresentou expressão significativa durante todo o processo de infecção para a atividade de β -1,3- glucanase e PAL. Para quitinases o tratamento com extrato

etanólico aumentou de forma significativa sua atividade em 12 hai, porém o nível expressivo de atividade foi para o tratamento com rutina no ponto de 24 hai. Para a atividade de peroxidases e polifenoloxidades todos os tratamentos induziram no ponto inicial com 12hai um aumento expressivo com destaque ao tratamento com o extrato etanólico. O tratamento com rutina apresentou um pico máximo com 24hai para ambas atividades enzimáticas, peroxidases e polifenoloxidades (Figura 17B).

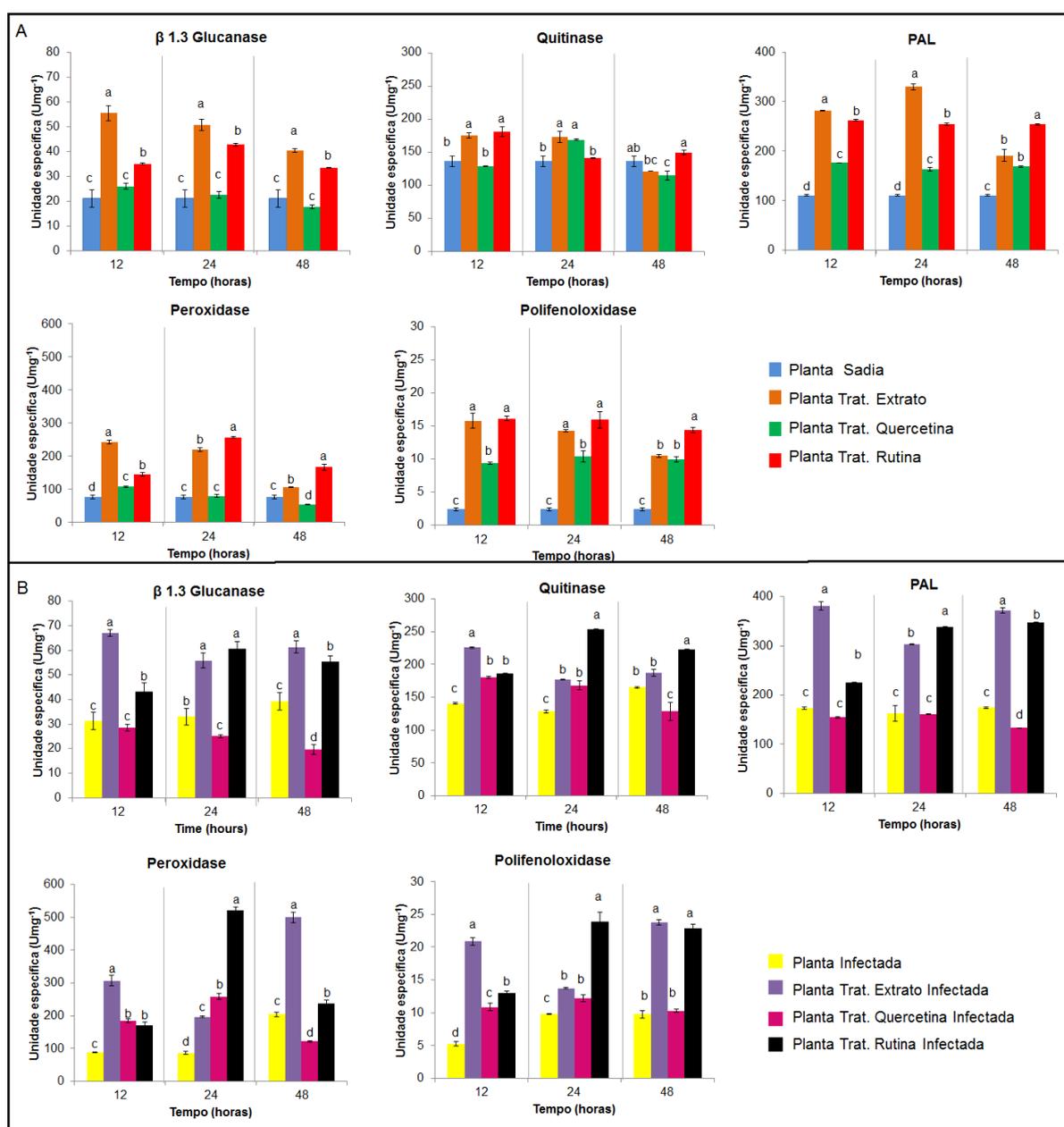


Figura 17 – Atividades enzimáticas durante o processo de infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*, quercetina e rutina. Os

tratamentos foram realizados com 0.2% v/v de extrato etanólico por folha e com 1.0 mg/L de quercetina e rutina respectivamente. (A) Cinética de tratamento em plantas sadias. (B) Cinética de infecção em plantas tratadas e após 24 horas inoculadas com o fungo. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.1.1.7.4 Análise da expressão gênica

Plantas de feijoeiro tratadas com extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, quercetina e rutina e inoculadas ou não por *S. sclerotiorum* foram analisadas quanto a expressão temporal de genes relacionados à patogênese: Proteína Relacionada à patogênese (*PvPR1*), β -1,3- glucanase (*PvPR2*) e Quitinase classe I (*PvCHIT*). (Figura 18).

Primeiramente foi avaliado o efeito do tratamento na expressão diferencial destes genes em plantas sadias. Para isto foram analisadas plantas que receberam os respectivos tratamentos, porém não foram inoculadas com o fungo (Figura 18A). Os resultados mostraram que nestas plantas, o gene *PvPR1* foi regulado positivamente durante todo o processo de infecção. O tratamento com extrato etanólico induziu o acúmulo deste transcrito de forma crescente durante o período avaliado. Isto foi também similar para o tratamento com rutina, porém no ponto de 48 hat houve um decaimento desta expressão (Figura 18A). Para o tratamento com quercetina foi observado um pico de expressão apenas no ponto de 24 hat. Em contraste, o gene *PvPR2* foi regulado positivamente apenas nas plantas tratadas com quercetina com 48 hat. O gene *PvCHIT* foi regulado positivamente inicialmente em 12 hat para o tratamento com rutina. Já para o tratamento com quercetina foi observado essa relação positiva com 24 hat. (Figura 18A).

Após avaliar a influência dos tratamentos em plantas sadias foi analisada a resposta dos pré-tratamentos no patossistema *P. vulgaris*-*S. sclerotiorum* (Figura 18B). Como controle deste experimento foram utilizadas plantas inoculadas e sem tratamento, onde foram observados elevados níveis de expressão dos transcritos referentes aos genes, *PvPR1*, *PvPR2* e *PvCHIT* avaliados, indicando a influência direta do fungo/infecção no acúmulo destes transcritos relacionados a resposta de defesa da planta.

Em plantas tratadas e após 24 horas inoculadas por *S. sclerotiorum* foi observado uma regulação positiva nos níveis destes transcritos, porém menor que nas plantas inoculadas e sem tratamento (Figura 18B). O gene *PvPR1* manteve sua expressão constante durante todo o processo inicial de infecção em plantas tratadas com o extrato etanólico. Por outro lado, foi altamente expresso inicialmente para o tratamento com quercetina em 12 hai e teve um decréscimo até o ponto de 48 hai. Para o tratamento com rutina foi observado apenas um pico no ponto de 24 hai. O gene *PvPR2* foi positivamente regulado apenas em plantas tratadas com rutina, e foi observado acúmulo de transcritos em 24 a 48 hai. Para o gene *PvCHIT* somente o tratamento com a rutina influenciou nos níveis de expressão em 12 hai porém inferior ao observado em plantas inoculadas não tratadas (Figura 18B).

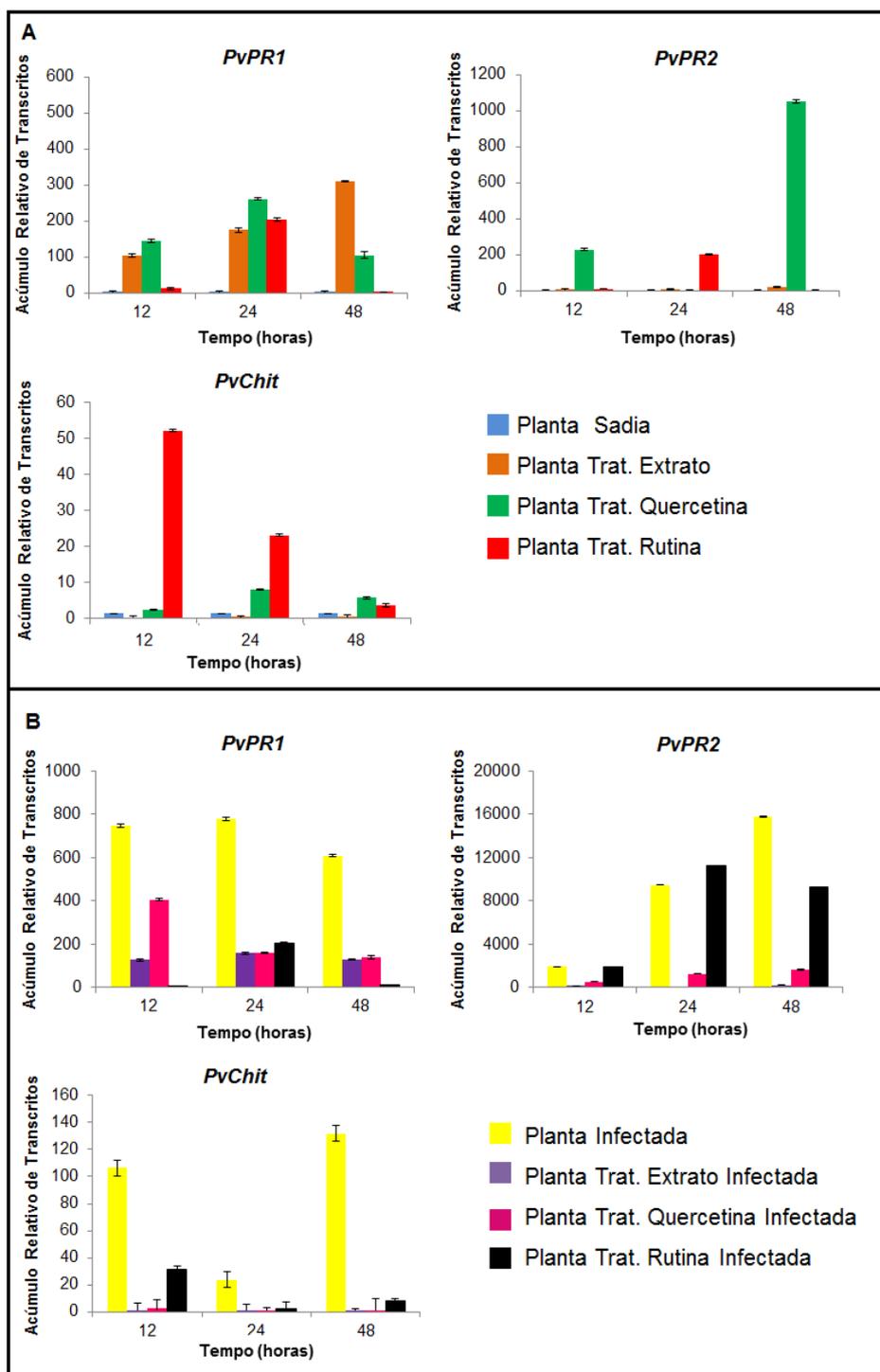


Figura 18 – Acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados a defesa durante o processo de infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro previamente tratadas com extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora*, quercetina e rutina. (A) Cinética de tratamento em plantas saudias. (B) Cinética de infecção em plantas tratadas e após 24 horas inoculadas com o fungo. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.1.2 Discussão

Neste trabalho foi avaliado os efeitos do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* e duas frações flavonoides, quercetina e rutina como potenciais compostos bioativos antagonistas ao fungo *S. sclerotiorum in vitro* e posteriormente o efeito de tais compostos como elicitores de defesa em plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) induzindo a resistência sistêmica adquirida. Estudos anteriores apresentaram o efeito de extratos etanólico de plantas sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. Extrato de folha de *Azadirachta indica* A. Juss (neem) mostrou-se eficiente no controle do oídio da ervilha e efeito antibacteriano sobre *Proteus vulgaris* e *Micrococcus luteus* (Sindhan et al. 1999), já o extrato de semente inibiu o desenvolvimento do nematoide *Heterodera glycines* (Silva et al. 2008). Domingues et al. (2009) observaram que os extratos de *Ruta graveolens* (arruda), *Allamanda cathartica* (allamanda), *Impatiens walleriana* (maria-sem-vergonha) foram eficazes no controle de *Sclerotium rolfsii*. Ojaghian et al. (2014) demonstraram a eficácia de controle sobre o *S. sclerotiorum* pelos extratos de *Cinnamomum cassia* Presl. (canela) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim).

No presente estudo foi avaliado o efeito direto do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* sob o crescimento do *S. sclerotiorum* e foi demonstrado inibição significativa do crescimento micelial radial bem como o efeito direto sobre a morte celular micelial. Aos dados de porcentagem de inibição em função das concentrações extrato foi ajustado o modelo linear de regressão. Segundo Bautista-Baños et al. (2002) os compostos fenólicos presentes nos extratos de plantas medicinais podem atuar de forma sinérgica, sendo assim compostos potenciais na atuação fungicidas ou fungistáticos. O extrato de *E. uniflora* possui em sua composição vários compostos fenólicos como a quercetina, kaempferol, galocatequina e miricitrina (Alice et al. 1991; Lee et al. 1997; Hoffmann-Ribani et al. 2009) e foi observado que no teste de inibição micelial as frações flavonoides, quercetina e rutina, não apresentaram o mesmo efeito inibitório de crescimento micelial quando comparado ao extrato etanólico ou o fungicida de referência ($p < 0,01$), assim infere-se que a atividade antifúngica do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* pode ser além da presença dos flavonoides e sim um efeito sinérgico com outros componentes.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão da morfologia da hifa tratada com extrato etanólico de *E. uniflora* demonstrou alterações no citoplasma com aumento do número e tamanho dos vacúolos além de elevado número de peroxissomos. Este resultado foi previamente relatado por outros trabalhos usando diferentes produtos naturais contra fitopatógenos. Foi observado que o efeito inibitório do crescimento do fungo pode estar associado com a degeneração da hifa causada por coagulação citoplasmática, intensa vacuolarização e perda da integridade da membrana (Liu et al. 2009, Tolouee et al 2010, Pârvu et al 2013, Shao et al 2013)

Sabe-se que os flavonoides são metabólitos secundários naturalmente sintetizados pelas plantas e atuam na defesa química contra estresse bióticos (Pietta 2000), porém a aplicação exógena de tais compostos para proteção de plantas ao ataque de patógenos exige maior elucidação. Neste contexto após determinar o efeito direto dos flavonoides e do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* sobre o desenvolvimento *in vitro* do *S. sclerotiorum* foi verificado o potencial de tais compostos como indutores da RSA em plantas de feijoeiro comum por aspectos bioquímicos e moleculares, como a análise dos níveis de proteínas de degradação da parede celular do fungo, quitinases e β -1,3- glucanase e proteínas que ativam a síntese de lignina, fenilalanina amônia-liase

A ativação do sistema de defesa da planta pode ser induzida pela aplicação de elicitores que poderão induzir o aumento da atividade de proteínas relacionadas a defesa da planta, como β -1,3- glucanase, quitinases e peroxidases bem como a ativação da via dos fenil isopropanoides que tem como indicador a atividade de fenilalanina amônia-liase. Esta via metabólica tem como função a síntese de compostos fenólicos de defesa como os flavonoides, as fitoalexinas e o fortalecimento da parede celular da planta pela síntese de lignina. Tais elicitores também ativam a expressão de genes relacionados à patogenicidade (PRs) responsáveis por codificar proteínas de degradação da parede fúngica (Ryals et al. 1996). Os resultados mostram que no patossistema *P. vulgaris*-*S. sclerotiorum* os tratamentos com extrato etanólico ou as frações flavonoides induzem no período inicial de infecção a resposta de defesa da planta através da atividades de β -1,3- glucanase, quitinases e peroxidases, e a indução gênica das principais PRs, indicando tais compostos como potenciais elicitores de defesa.

Os dados mostraram que a aplicação dos tratamentos diretamente no tecido foliar das plantas de feijoeiro comum, em baixas doses, inibiram o desenvolvimento da doença, principalmente para o tratamento com o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* e a rutina. Este padrão de resposta também foi encontrado por Boubakri et al. (2012), nos quais avaliaram um composto de estrutura química similar aos flavonoides, a tiamina. Doses baixas desta vitamina aplicadas diretamente no tecido foliar induziu resistência em plantas de videira sobre o fungo *Plasmopara viticola* (míldio da videira).

Foi observado que o tratamento com quercetina não apresentou o mesmo potencial elicitor quando comparado aos outros compostos testados. Assim como em outros microrganismos, *Beauveria bassiana* (Costa et al. 2011), *Verticillium dahliae* (El Hadrami et al. 2011), *Aspergillus japonicus* e *Bacillus subtilis* (Merkens et al. 2007), os dados mostram que o *S. sclerotiorum* também é capaz de degradar a quercetina, pela atividade da quercetinase (quercetina 2,3-dioxigenase) durante o processo de infecção. Neste contexto o tratamento com a quercetina não apresentou o efeito esperado no patossistema *P. vulgaris*-*S. sclerotiorum*, indicando que durante o processo de infecção o *S. sclerotiorum* apresenta mecanismos de detoxificação de metabólitos secundários de defesa da planta. Pedras; Ahiahonu (2005) apresentaram que em adição as proteínas de degradação de parede o fungo *S. sclerotiorum* é capaz de produzir transferases que detoxificam por reações de glicosilação os metabólitos secundários das plantas, incluindo os flavonoides e as fitoalexinas.

Além da atividade de quercetinase o fungo *S. sclerotiorum* também apresenta atividade de oxidoredutases durante o processo de infecção que são fatores que contribuem para o sucesso de sobrevivência do fungo (Kim et al. 2011; Coman et al. 2013). Neste processo o fungo induz estresse oxidativo no tecido hospedeiro e a morte celular programada, caracterizando assim um estágio importante para a colonização deste patógeno necrotrófico (Kim et al. 2011). Dentre as oxidoredutases estão as lacases, que apresentam como função a oxidação de fenóis e degradação de lignina, através da redução molecular do oxigênio a água, além de serem importantes precursoras das espécies reativas de oxigênio (Leonowicz; Grzywnowicz 1981; Eggert et al. 1996).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que na presença de baixas concentrações do extrato etanólico de *E. uniflora* o fungo *S.*

sclerotiorum diminuiu a atividade de lacase. Considerando a interação planta-patógeno este dado sugere a participação desta enzima e conseqüentemente a atuação do fungo na modulação do estresse oxidativo durante o processo de infecção. Corroborando com esta hipótese foi demonstrado por Kim et al. (2011) que identificaram uma NADPH oxidase de *S. sclerotiorum* e demonstraram que mutantes deficientes desta oxidase induziram um aumento da explosão oxidativa em plantas de tomate, além de uma diminuição na capacidade de estabelecer a doença.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, bem como sua fração flavonoide rutina, exibiram efeito inibitório sobre o desenvolvimento do mofo branco causado pelo *Sclerotinia sclerotiorum* e representam moléculas bioativas potenciais para a indução de resistência em plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*).

4.2. CAPÍTULO 02 - Óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos sobre o mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).

4.2.1 Resultados

4.2.1.1 Identificação dos compostos químicos do óleo essencial de folhas *Eugenia uniflora*

O óleo essencial de folhas *Eugenia uniflora* foi extraído e seus componentes químicos foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção conforme proposto por Adams (2007). Os índices de retenção foram calculados através da coinjeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C 9 – C 22 e utilização da equação de Van Den Dool; Dec Kratz (1963).

Foi possível identificar 15 compostos listados na tabela 3. Os compostos majoritários foram selina-1,3,7(11) trien-8-one (32,39%), selina-1,3,7(11) trien-8-one epoxide (28,62%), β Germacrene (10,64%) e curzerene (5,69%).

4.2.1.2 Efeito do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o crescimento micelial e desenvolvimento de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

A atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* foi avaliada sobre o fungo *S. sclerotiorum* (Figura 19).

Os dados obtidos mostram que a inibição do crescimento foi positivamente correlacionada com o aumento da concentração do óleo essencial. A concentração inibitória mínima para o *S. sclerotiorum* foi de 100 ppm do óleo essencial, com redução do crescimento micelial radial de 10% em relação ao controle com 48hai. Nas concentrações a partir de 1000 ppm do óleo essencial a inibição micelial foi superior a 27% com 48 e 72 hai (Figura 19).

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*.

Nº	Componente	RI ^a	% Composição
Monoterpenos oxigenados			0.24 ^b
1.	Linalool	1093.66	0.24
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			19.67 ^b
2.	δ Elemene	1331.54	0.21
3.	β Elemene	1386.60	3.62
4.	Z Caryofileno	1413.08	0.31
5.	γ Elemene	1427.10	0.59
6.	γ Murolene	1474.82	1.62
7.	β Selinene	1479.86	0.65
8.	Α Germacrene	1497.49	1.77
9.	δ Amorphene	1516.18	0.26
10.	β Germacrene	1553.00	10.64
Sesquiterpenos oxigenados			74.87 ^b
11.	Curzerene	1491.16	5.69
12.	Atractylone	1670.25	0.37
13.	Germacrone	1691.32	7.80
14.	Selina -1,3,7 (11) trien -8 one	1629.02	32.39
15.	Selina -1,3,7 (11) trien -8 one epoxide	1743.10	28.62
Total Identificados			94.79
Total Não Identificados			5.21

^a Índice de retenção (RI) relativo às séries homólogas dos n-alcanos (C9-C24) sobre a coluna capilar de sílica Rtx-5.

^b Somatório da composição percentual de todas as frações. pertencentes ao mesmo grupo químico.

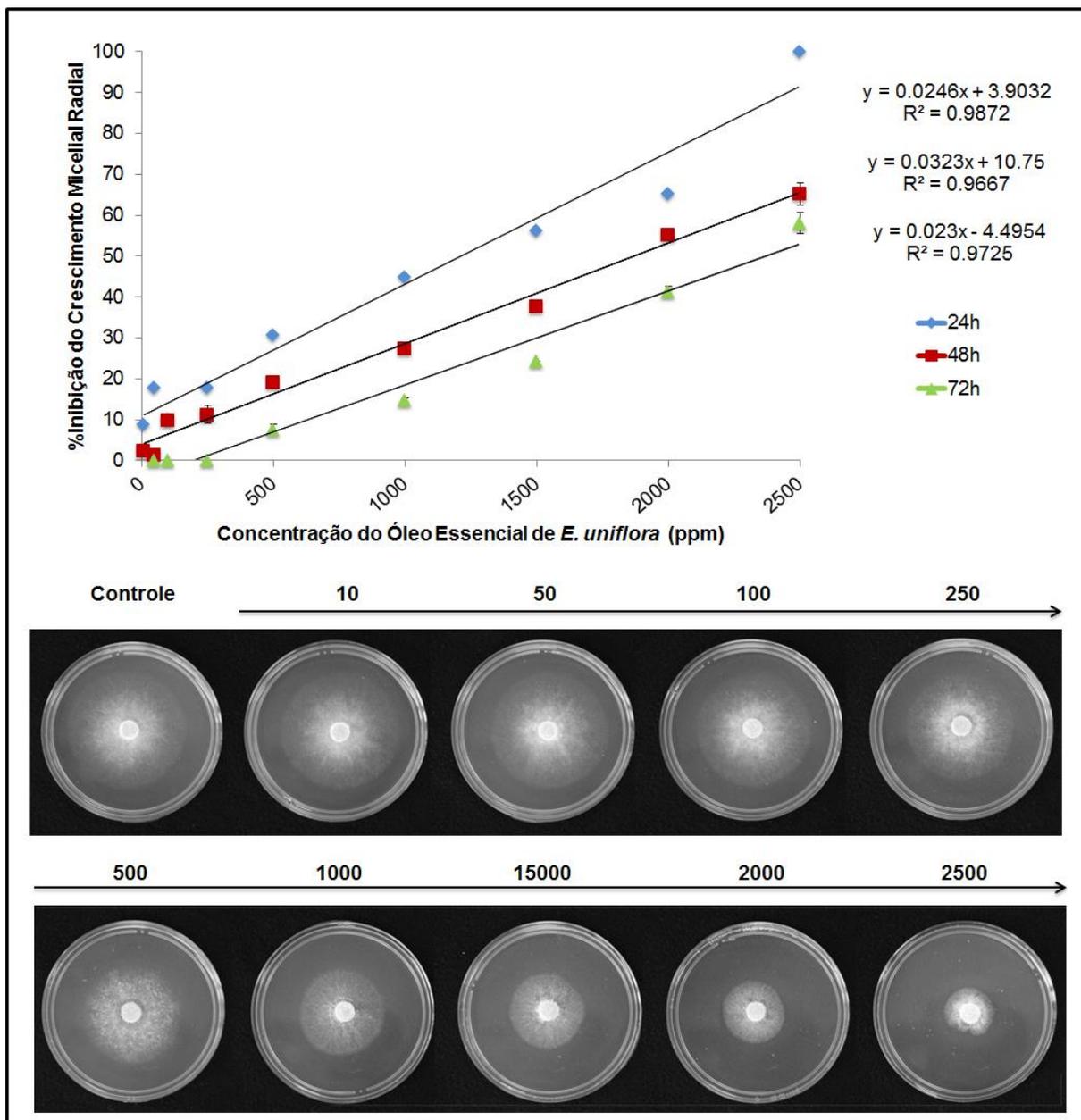


Figura 19 – Efeito do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o crescimento radial do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. O percentual de inibição do crescimento micelial em concentrações crescentes do óleo essencial em meio BDA foi avaliado nos pontos de 24, 48 e 72 horas após inoculação em relação ao controle do experimento.

O efeito do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* sob o crescimento micelial do fungo foi comparado com o efeito do fungicida de referência, fluazinam (Figura 20). Os resultados mostram que o aumento da concentração do óleo essencial correlacionou-se significativamente ($p < 0,01$) com a inibição do crescimento micelial radial. Nas concentrações acima de 500 ppm do óleo essencial

a inibição do fungo foi superior a 20% e na maior concentração testada (2500 ppm) foi de 65% de inibição comparada ao fungicida fluazinam, que inibiu 100% do crescimento micelial em todas as concentrações testadas (Figura 20).

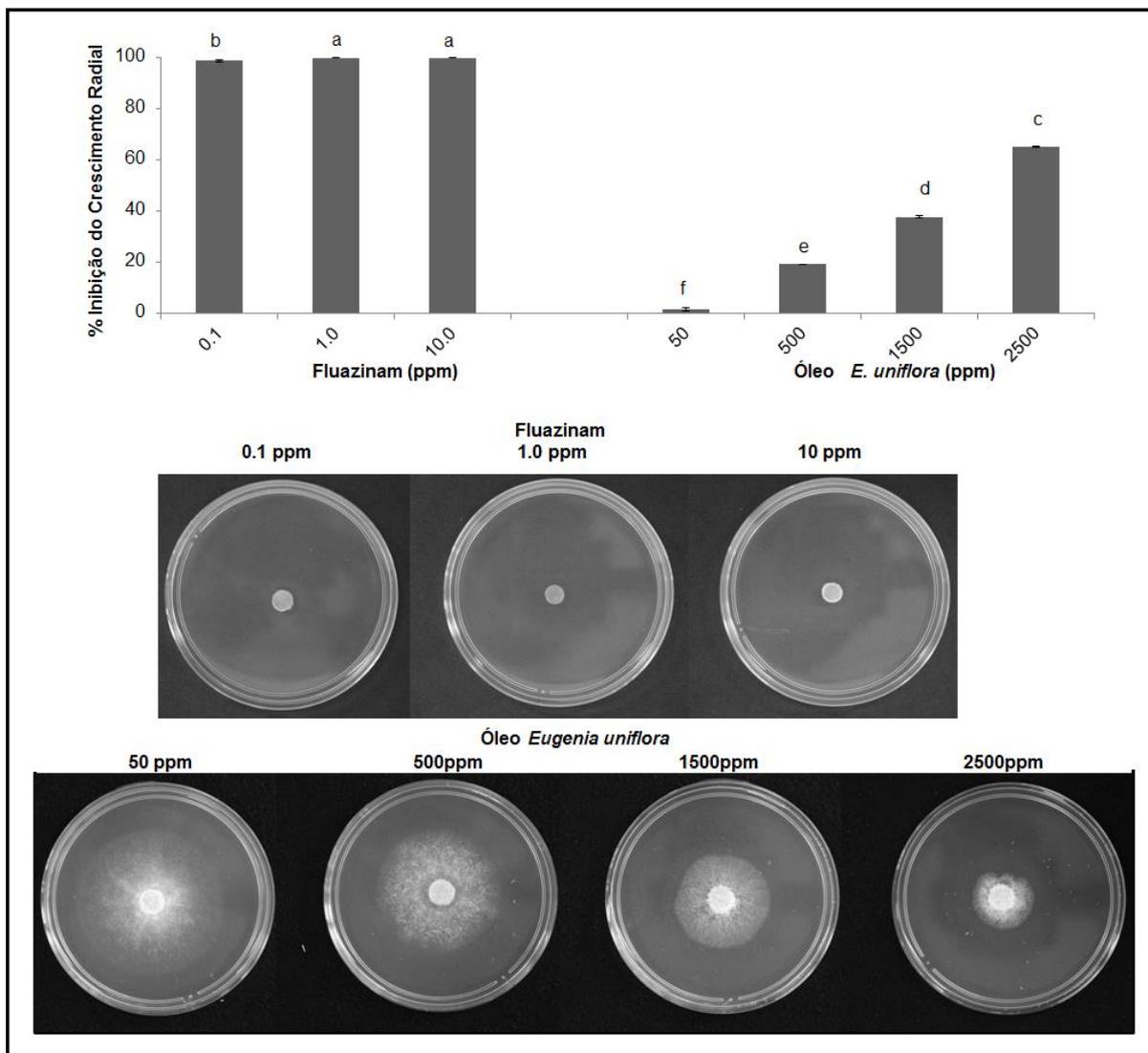


Figura 20 - Percentual de inibição crescimento radial do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* e fluazinam. O fungicida comercial fluazinam foi o composto controle positivo. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Após o teste de crescimento micelial, o efeito do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o desenvolvimento de escleródios de *S. sclerotiorum* foi avaliado (Figura 21). Os dados mostram que na presença do tratamento, para as

concentrações de 10, 250 e 500 ppm, o número de escleródios formados foi maior quando comparado ao controle (sem tratamento), porém o peso médio de tais escleródios foi inferior. Foi observado também que na concentração de 1500 ppm do óleo essencial não houve o desenvolvimento de escleródios (Figura 21).

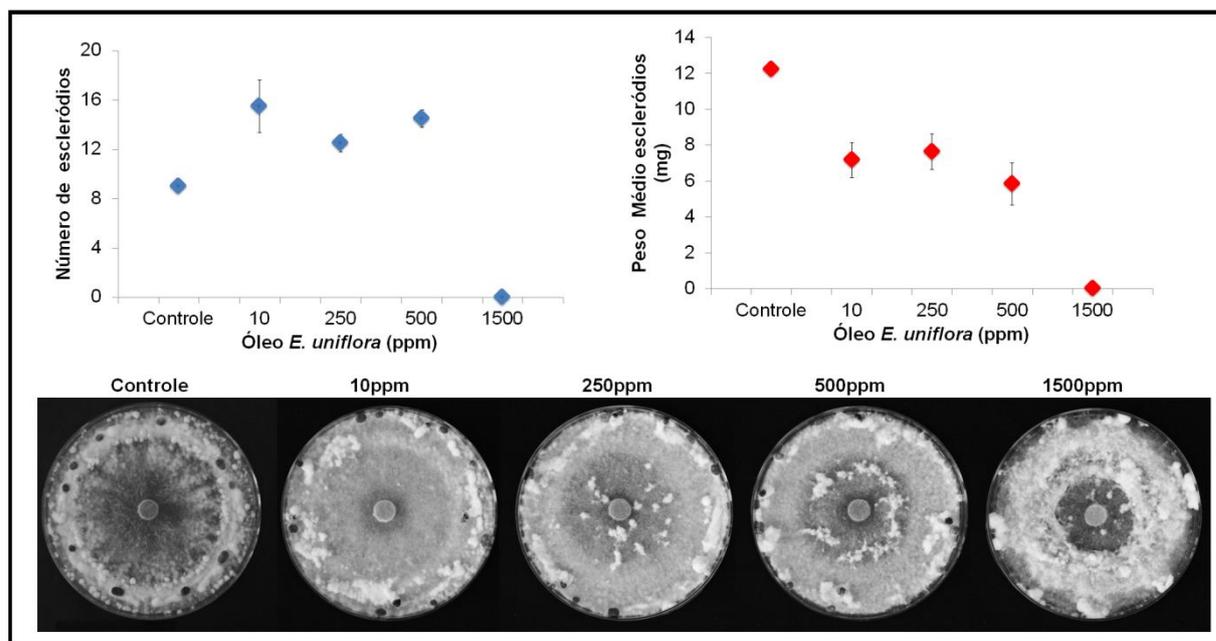


Figura 21 - Desenvolvimento *in vitro* de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* formados em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. O efeito de 10, 250, 500 e 1500 ppm do óleo essencial em meio BDA foi avaliado 15 dias após inoculação para formação de escleródios. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.2.1.3 Efeito do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a análise de viabilidade, os escleródios de *S. sclerotiorum* formados em placas suplementadas com óleo essencial de *E. uniflora* (500 e 1000 ppm) foram desinfetados e plaqueados em meio BDA. O micélio desenvolvido foi mensurado diariamente (Figura 22). Foi observado que a germinação micelial dos escleródios desenvolvidos em placas suplementadas com óleo essencial de *E. uniflora* foi retardada em 24 hai. Enquanto o controle demonstrou uma taxa de crescimento micelial radial de 20.0 ± 0.1 (mm/dia) e os escleródios oriundos do tratamento

apresentaram taxa de crescimento de 9.4 ± 0.96 e 7.9 ± 2.1 (mm/dia) respectivos às concentrações de 500 e 1000 ppm testadas (Figura 22).

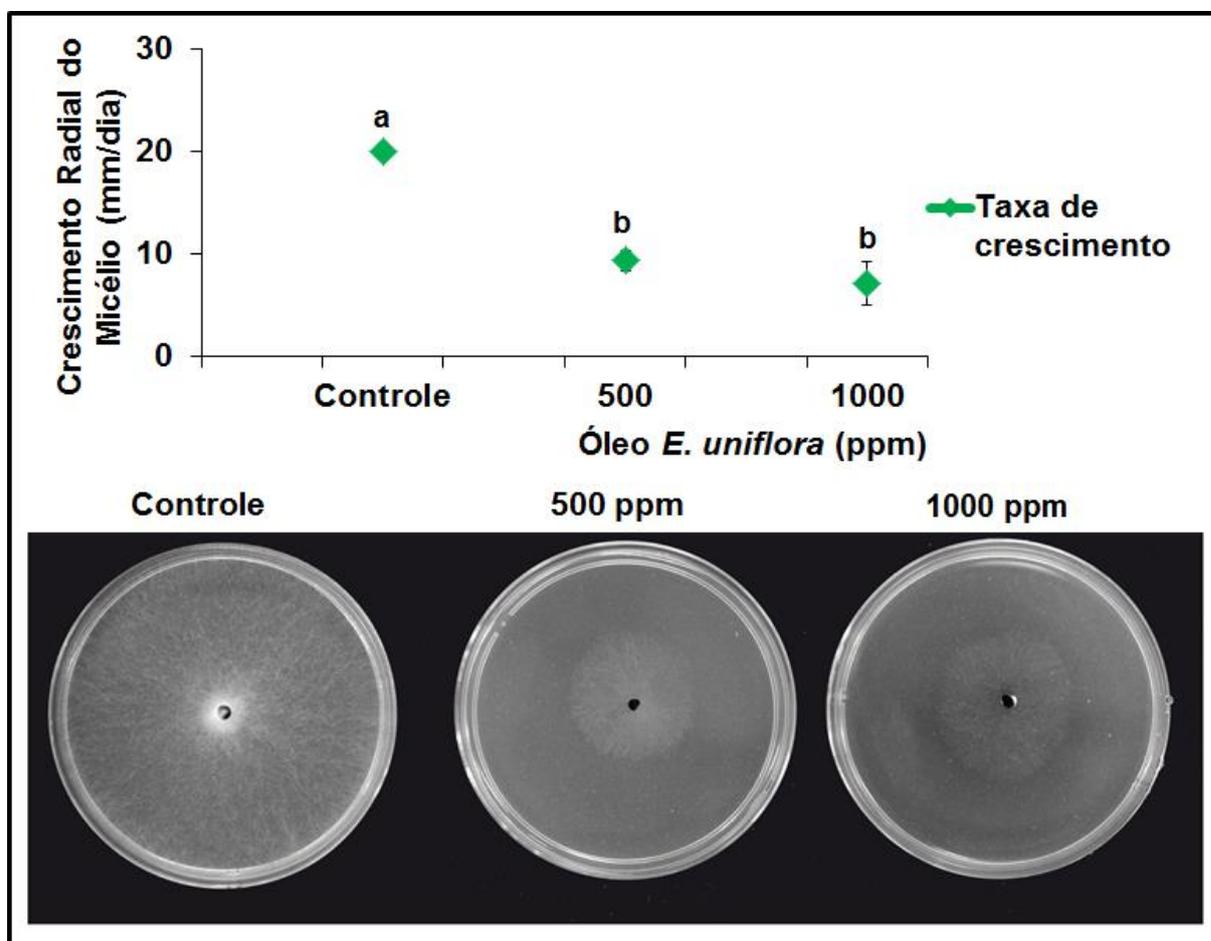


Figura 22 – Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* desenvolvidos em meio BDA suplementado com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. O crescimento micelial a partir de escleródios que foram formados em meio BDA suplementado com 500 e 1000 ppm de óleo essencial foi avaliado 7 dias após a inoculação. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.2.1.4 Efeito do óleo essencial de folhas *Eugenia uniflora* sobre a incidência da doença mofo branco em plantas de feijoeiro comum

4.2.1.4.1 Teste de folha destacada

O óleo essencial de folhas de *E. uniflora* foi testado como regulador do desenvolvimento do mofo branco em plantas de feijoeiro (Figura 23). Os dados

mostram que as folhas previamente tratadas com óleo essencial de folhas de *E. uniflora* não desenvolveram manchas necróticas visíveis durante os estágios iniciais de infecção, 12, 24 e 48 hai, em comparação as folhas controle não tratadas (Figura 23).

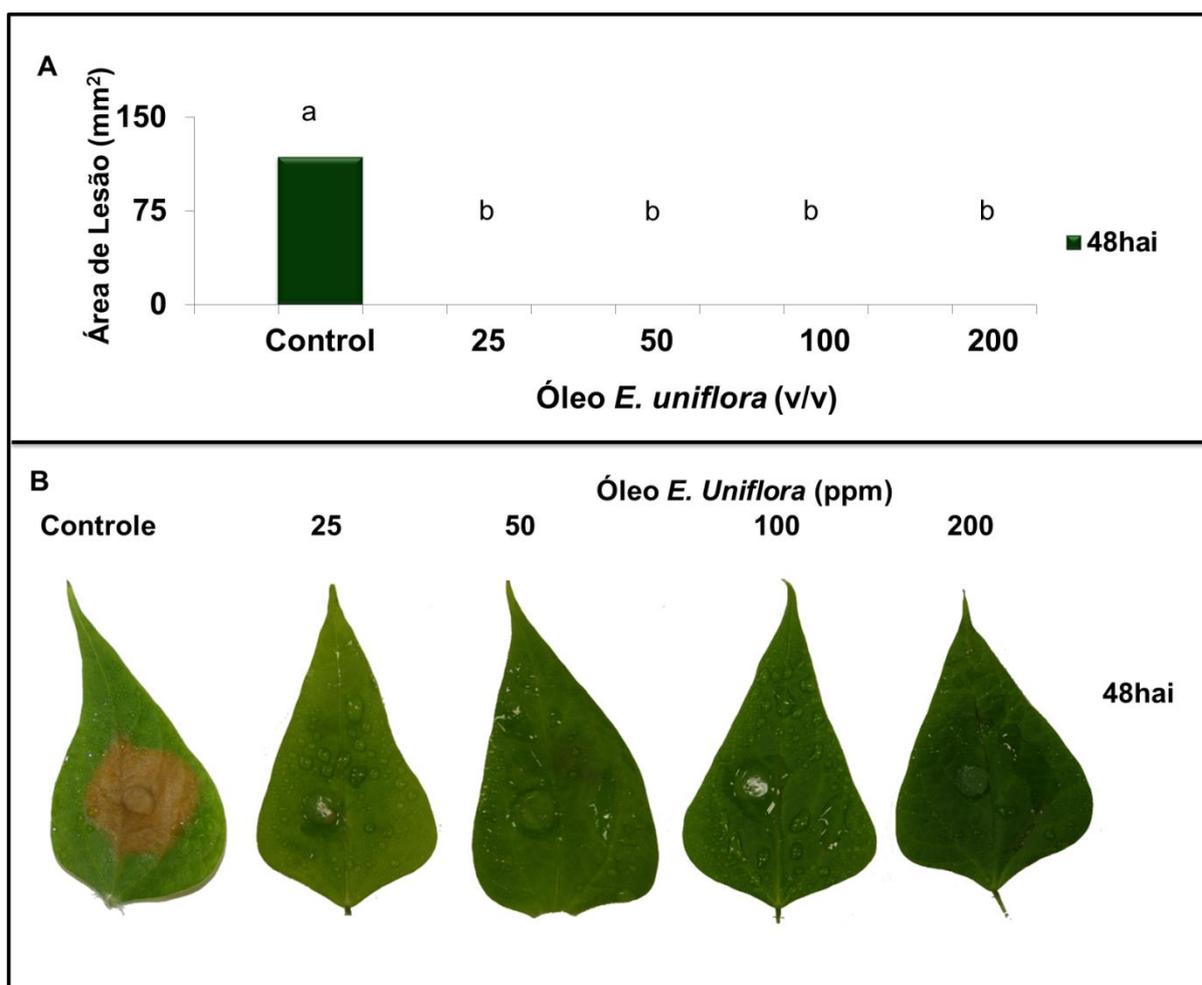


Figura 23 - Desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de feijoeiro comum previamente tratadas com concentrações crescentes de óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. A área de lesão formada nas folhas tratadas foi mensurada após 48 horas de inoculação do fungo e o percentual de inibição da lesão foi avaliado em relação as folhas destacadas controle (sem tratamento). (A) Área de lesão em mm². (B) Folhas destacadas. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.2.1.4.2 Lesão macroscópica *In vivo*

A resposta das plantas de feijoeiro frente ao tratamento com o óleo essencial de folhas *E. uniflora* foi avaliada. Foi observado que as plantas controle inoculadas com o fungo *S. sclerotiorum* apresentaram alta área de infecção com 48 hai (Figura 24A) enquanto as plantas previamente tratadas com óleo essencial de folhas de *E. uniflora* e após 24 horas inoculadas com o fungo apresentaram menor área de lesão (Figura 24B).

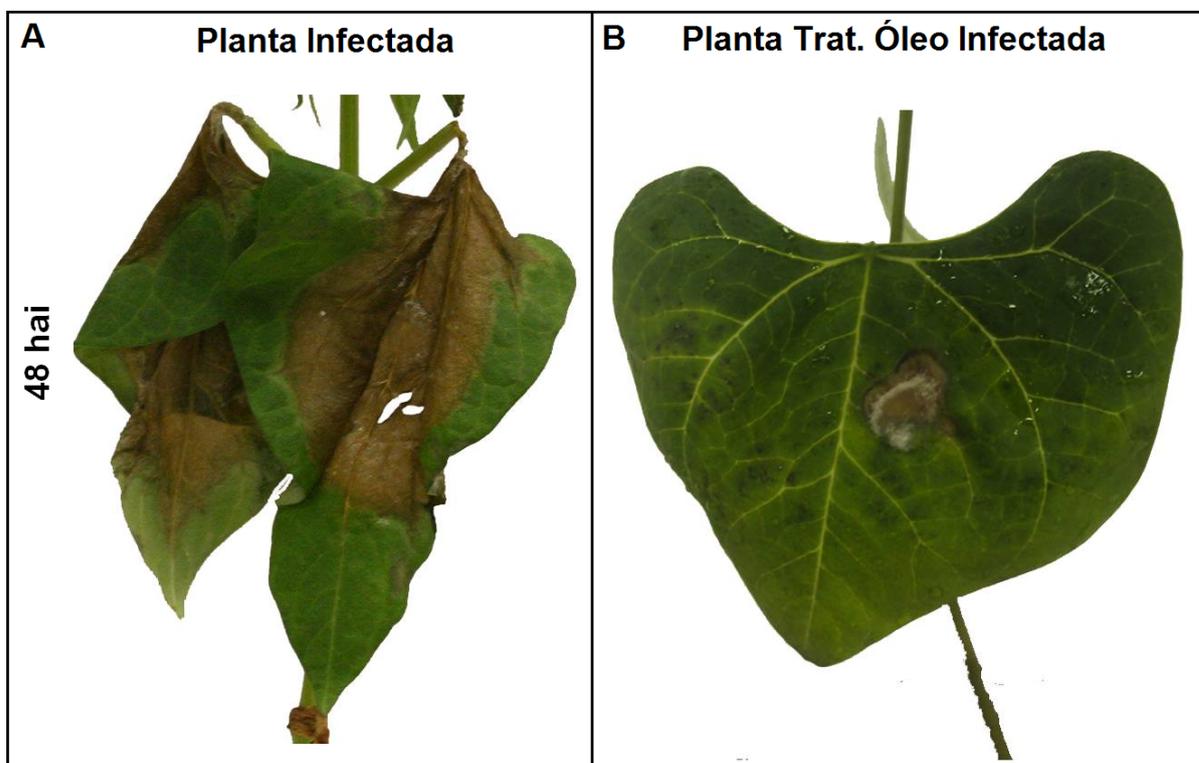


Figura 24 - Desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. A área de lesão formada foi avaliada com 48 horas após inoculação do fungo. (A) Planta controle infectada. (B) Planta tratada com 200 ppm de óleo essencial e após 24 horas de tratamento inoculadas com o fungo.

4.2.1.4.3 Análise bioquímica

No aspecto bioquímico algumas proteínas relacionadas à defesa da planta, como quitinases, β -1,3- glucanase, PAL, peroxidases e polifenoloxidasas, tiveram suas atividades mensuradas (Figura 25). Primeiramente foi avaliado o efeito do óleo em uma cinética de tratamento. Foi observado que as plantas sadias tratadas com o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* apresentaram alterações significativas ($p < 0,01$) nos níveis das atividades enzimáticas analisadas quando comparado as plantas sadias sem tratamento (Figura 25A). As atividades apresentaram o mesmo padrão de cinética enzimática, com um aumento inicial com 12 hat seguido de um decaimento em 24 hat e posterior aumento em 48 hat. Este resultado sugere que o tratamento com o óleo essencial induz os mecanismos de resposta da planta mesmo sem a presença do patógeno, atuando assim como um potencial elicitor de defesa (Figura 25A).

Ápos avaliar o efeito do óleo essencial em uma cinética de tratamento das plantas de feijoeiro foi avaliado seu efeito por uma cinética de infecção pelo fungo. Assim plantas de feijoeiro foram tratadas com 200 ppm de óleo essencial de *E. uniflora* e após 24 horas inoculadas com o fungo *S. sclerotiorum* (Figura 25B). Foi observado que na cinética de infecção as atividades de quitinases, β -1,3- glucanase, PAL, peroxidases e polifenoloxidasas foram ativadas e apresentaram respostas significativas em relação as plantas infectadas que não receberam tratamento (Figura 25B).

Os resultados mostram que no período inicial de infecção (12hai) ocorreu um aumento significativo no nível das atividades específicas analisadas, principalmente para as polifenoloxidasas (Figura 25B). As atividades da β -1,3- glucanase e quitinases apresentaram o mesmo padrão de cinética enzimática, com um aumento inicial com 12hai, decaimento em 24 hai e posterior aumento em 48 hai. As atividades da PAL, e peroxidases apresentaram um pico em 48hai (Figura 25B).

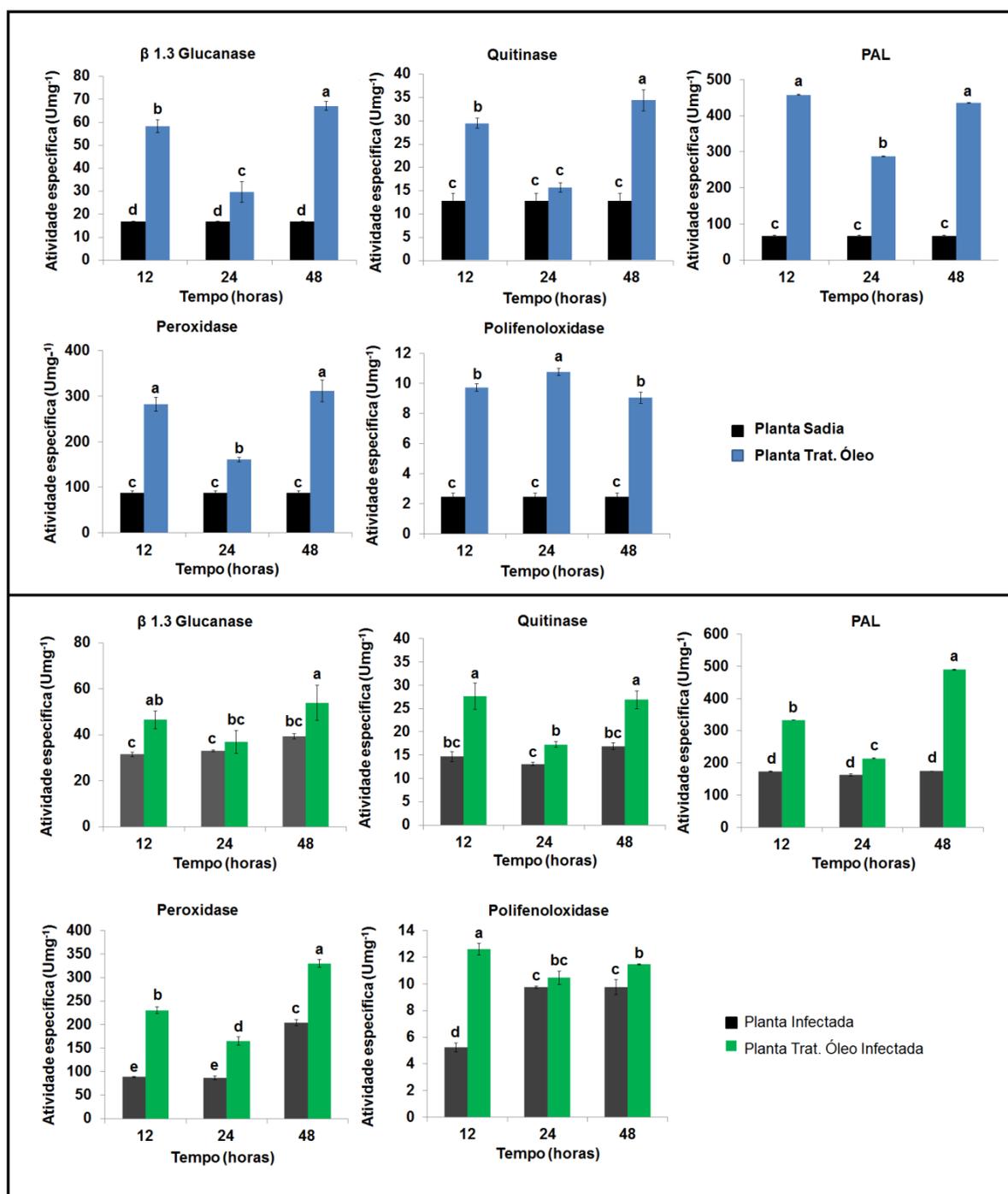


Figura 25 – Atividades enzimáticas durante o processo de infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. O tratamento foi realizado com 200 ppm de óleo essencial por folha. (A) Cinética de tratamento em plantas sadias. (B) Cinética de infecção em plantas tratadas e após 24 horas inoculadas com o fungo. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.2.1.4.4 Análise da expressão gênica

A resposta da planta frente ao tratamento com o óleo essencial foi avaliada quanto a expressão temporal de genes relacionados a resposta de defesa: Proteína Relacionada à patogênese (*PvPR1*), β -1,3- glucanase (*PvPR2*) e Quitinase classe I (*PvCHIT1*), Lipoxigenase (*PvLOX*), Fenilalanina amônia-liase (*PvPAL*), α -dioxigenase (*PvDOX*) e Farnesil pirofosfato sintase 1 (*PvFPS1*) (Figura 26).

Primeiramente foi avaliada a expressão destes genes em plantas sadias tratadas com o óleo essencial (plantas sem o inóculo do fungo) (Figura 26A). Os resultados mostram que nas plantas tratadas, os genes analisados foram regulados positivamente durante a cinética (12, 24 e 48 hat), exceto para os genes *PvCHIT1* (Quitinase classe I) e *PvFPS1* (Farnesil pirofosfato sintase 1), os quais em plantas sem tratamento apresentaram maior acúmulo de transcritos. O gene *PvPR1* (relacionada à patogênese), apresentou pico de expressão nos pontos de 12 e 24 hat. Os genes *PvPR2* (β -1,3- glucanase), *PvCHIT1* (Quitinase classe I), *PvLOX* (Lipoxigenase), *PvPAL* (Fenilalanina amônia-liase) e *PvFPS1* (Farnesil pirofosfato sintase 1) apresentaram a mesma cinética de expressão com acúmulo crescente de transcritos após o tratamento. O gene *PvDOX* (α -dioxigenase) apresentou nível constante de transcritos com um aumento em 24 hat (Figura 26A).

Para as plantas pré-tratadas com o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* e após 24 horas inoculadas com *S. sclerotiorum* a expressão destes genes foi diferencial em relação às plantas inoculadas (sem tratamento). Foi observado maior acúmulo de transcritos durante o processo de infecção para os genes *PvPR1*, *PvPR2*, *PvCHIT1*, *PvPAL* e *PvDOX* (Figura 26B).

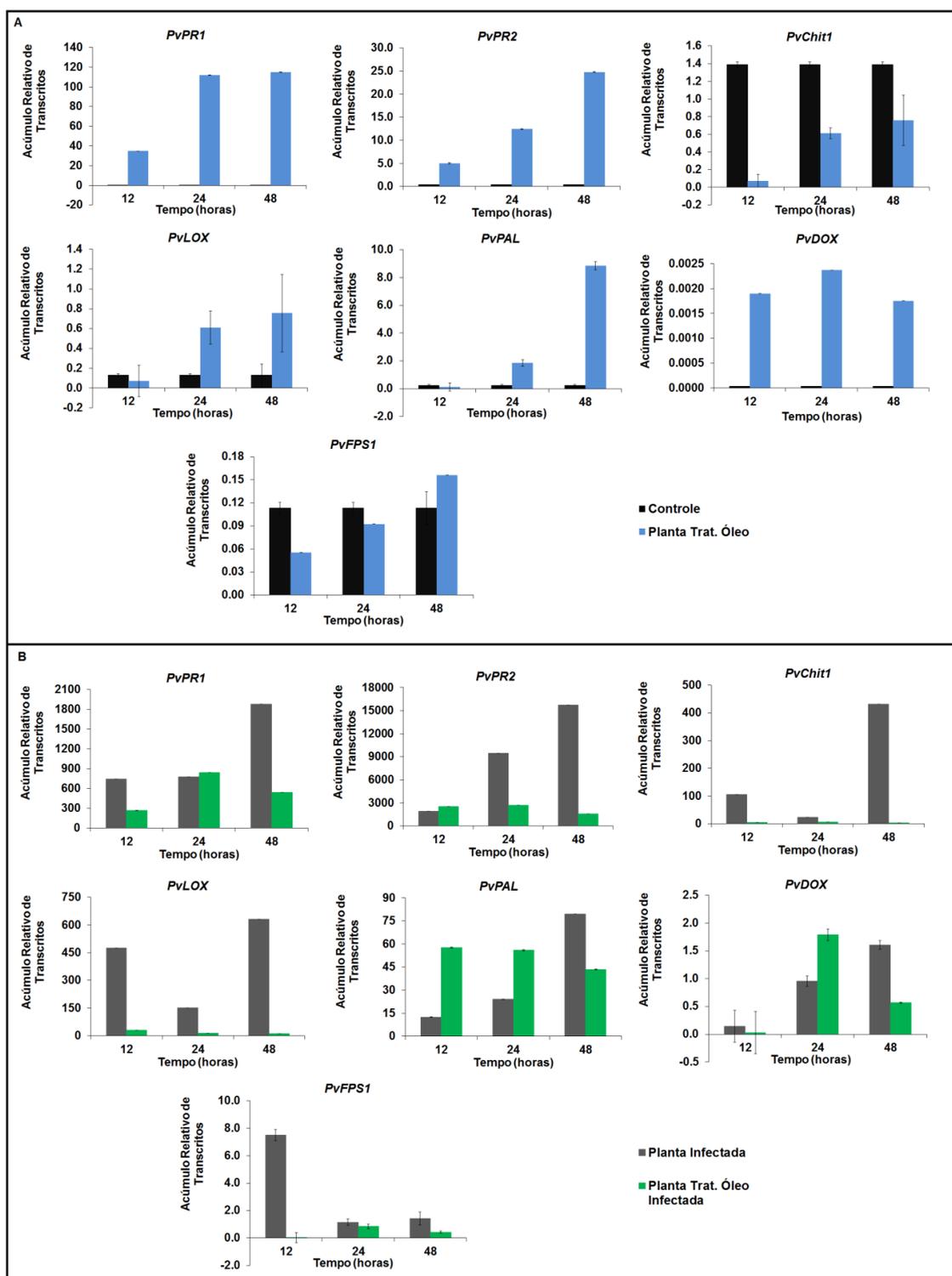


Figura 26 – Acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados a defesa durante o processo de infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro comum previamente tratadas com óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*. (A) Cinética de tratamento em plantas saudáveis. (B) Cinética de infecção em plantas tratadas e após 24 horas inoculadas com o fungo. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

4.2.2 Discussão

Os óleos essenciais extraídos de plantas são compostos geralmente constituídos de uma mistura de terpenos, terpenoides, aldeídos e álcoois (Laird; Phillips 2012). São moléculas de interesse biotecnológico devido as suas atividades biológicas, como antibacteriana, atividades antifúngica e inseticida. Muitos destes óleos são comercialmente importantes e apresentam diversas aplicações, como antioxidantes e na conservação de alimentos (Teixeira et al. 2013), potencial farmaterapêutico (Amorim et al. 2009), indústrias de cosméticos e perfumes além de ampla atividade antimicrobiana (Burt 2004; Bakkali et al. 2008). No presente trabalho o óleo essencial obtido de folhas de *E. uniflora* foi avaliado como potencial fungistático sobre o fungo *S. sclerotiorum*, bem como elicitador de defesa em plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*).

A constituição e a concentração do óleo essencial de *E. uniflora* é variável, sendo os principais aspectos que influenciam em sua constituição estão relacionado ao estágio de desenvolvimento da planta, o período do ano de coleta das folhas para extração, condições adversas do ambiente, como temperatura, umidade e nutrição, estresses bióticos, bem como o método escolhido para extração do óleo (Adebajo et al. 1989; Galhiane et al. 2006). Esta variação na constituição do óleo de *E. uniflora* também foi observada por outros trabalhos, nos quais os principais compostos encontrados foram germacreno, β germacreno e curzereno (Maia et al. 1999), curzereno, selina-1,3,7(11) trien-8-one e atractilona (Ogunwande et al. 2005), curzereno e β curzereno (Melo et al. 2007), selina-1,3,7(11) trien-8-one e atractilona (Brun; Mossi 2010), curzereno, β germacreno e β curzereno (Peixoto et al. 2010). Nossos resultados qualitativos sobre a composição química do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* corroboram com os outros estudos, sendo os compostos mais abundantes o selina-1,3,7(11) trien-8-one, selina-1,3,7(11) trien-8-one epoxide, β germacreno e curzereno.

A atividade antibactericida do óleo essenciais extraídos de folhas de *E. uniflora* foi relatada para *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Xanthomonas campestris* (Brun; Mossi 2010), *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Ogunwande et al. 2005), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* (Coelho De Souza et al. 2004), porém seu efeito sobre fungos fitopatogênicos foi pouco descrito.

Neste trabalho a avaliação do efeito direto do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o *S. sclerotiorum* demonstrou uma resposta dose-dependente para o tratamento. Corroborando com este resultado diversas pesquisas investigaram o efeito antimicrobiano de distintos óleos essenciais produzidos por plantas no controle de fungos fitopatogênicos, como o *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) (Edris; Farrag 2003; Soylu et al. 2007), *Rhizopus stolonifer* (bolor negro de pão), *Mucor* sp. (Edris; Farrag 2003), *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) (Romagnoli et al. 2005; Soylu et al. 2010; Badawy; Abdelgaleil 2014), *Alternaria alternata* (mancha marrom de alternaria) (Chen et al. 2014), *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (fusariose) (Badawy; Abdelgaleil 2014), *Pythium*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia minor* e *Rhizoctonia solani* (podridão do rizoma) (McMaster et al. 2013), *Alternaria alternata* e *Penicillium digitatum* (bolor verde) (Abdolahi et al. 2010), *Geotrichum citri-aurantii* (podridão azeda) (Liu et al. 2009), *Phytophthora infestans* (requeima) (Soylu et al. 2006).

Infere-se que os principais compostos responsáveis por tais propriedades antimicrobianas são os componentes fenólicos (Cosentino et al. 1999). Segundo Parveen et al. (2004) a ação antifúngica dos óleos essenciais ricos em monoterpenos é devida a ativação de genes que atuam no metabolismo dos lipídios e desintoxicação celular. Porém os mecanismos que conferem aos óleos essenciais o potencial de alterar o metabolismo de microrganismos exige maior elucidação.

Por apresentarem uma constituição hidrofóbica, os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana plasmática causando alterações na estrutura celular (Bakkali et al. 2008). Estes aspectos foram apresentados por alguns trabalhos que avaliaram o efeito de óleos essenciais sobre a morfologia celular de fungos fitopatogênicos, os quais demonstraram a ramificação irregular das hifas terminais, rompimento da membrana plasmática, espessamento significativo da parede celular, aumento dos vacúolos e mitocôndrias distorcidas do micélio do *Geotrichum citri-aurantii* (podridão azeda) (Liu et al. 2009) e do micélio de *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) (Romagnoli et al. 2005), além de coagulação citoplasmática, aumento de vacúolos, hifas dessecadas e vazamento de protoplastos observado em hifas e conídios de *Phytophthora infestans* (requeima) (Soylu et al. 2006).

No presente estudo foi demonstrado que o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* exibiu efeito inibitório sobre o mofo branco causado pelo *S. sclerotiorum* e

representa um composto bioativo potencial na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum (*P. vulgaris*).

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que o extrato etanólico e óleo essencial de folhas *E. uniflora* e a fração flavonoide rutina, são moléculas bioativas potenciais *in vitro* para reduzir a severidade da doença mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Porém, estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação destes compostos no patossistema *Phaseolus vulgaris*-*Sclerotinia sclerotiorum* são ainda necessários, sendo esta uma área de interesse para a prospecção de novos compostos que atuem como elicitores de defesa em plantas.

6. PERSPECTIVAS

1. Avaliar o potencial de uso destas biomoléculas no controle da reprodução carpogênica do fungo *S. sclerotiorum*, através da inibição da formação de apotécios e viabilidade de ascóporos.
2. Avaliar o efeito de partições do extrato etanólico e taninos extraídos de folhas de *Eugenia uniflora* sobre o patossistema *Phaseolus vulgaris*-*Sclerotinia sclerotiorum*.
3. Estudar os mecanismos de detoxificação utilizados pelo fungo na interação planta-patógeno.
4. Avaliar a utilização do filme biodegradável composto de álcool polivinílico e polissacarídeo de goma de caju contendo partições do extrato etanólico imobilizados no controle de *S. sclerotiorum*. E avaliar o efeito protetor destas biomoléculas imobilizadas no filme biodegradável como embalagens para armazenamento de frutos de interesse comercial, como o morango.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abawi GS, Grogan RG. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 1979;69(8):899-904.

Abdolahi A, Hassani A, Ghosta Y, Javadi T, Meshkatalasadat MH. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. *J Food Saf* 2010;30(2):341-52.

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation; 2007.

Adebajo AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. *Phytother Res* 1989;3(6):258-59.

Agrios GN Losses caused by plant diseases. *Plant Pathology*, UK:Elsevier, Oxford 2004.

Alice CB, Vargas VMF, Silva GAAB, De Siqueira NCS, Schapoval EES, Gleye J, et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol* 1991;35(2):165-71.

Amorim ACL, Lima CKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 1997;16(10):923-28.

Annis SL, Goodwin PH. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur J Plant Pathol* 1997;103(1):1-14.

Arcury TA, Quandt SA, Russell GB. Pesticide Safety Among Farmworkers: Perceived Risk and Perceived Control as Factors Reflecting Environmental Justice. *Environ. Health Perspect.* 2002;110:233-40.

Auricchio MT, Bacchi EM. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2003;62(1):55-61.

Badawy ME, Abdelgaleil SA. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Ind Crops Prod* 2014;52(1):776-82.

Bailey JA, Mansfield JW. *Phytoalexins*. New York:John Wiley and Sons; 1982.

Bajpai VK. In Vitro and In Vivo Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Essential Oil and Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J. Agric. Sci. Technol.* 2012;14(4):845-56.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):446-75.

Bardin SD, Huang HC. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada¹. *Can J Plant Pathol* 2001;23(1):88-98.

Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 2000;71:S110-16.

Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Bravo-Luna L, Bermúdez-Torres K. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Rev Mex Fitopatol* 2002;20(1):8-12.

Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell Online* 2007;19(1):148-62.

Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can J Plant Pathol* 1994;16(2):93-108

Boller T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3glucanases. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ. *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. UK:Oxford University Press; 1992. p. 23–30.

Bolton MD, Thomma BP, Nelson BD. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 2006;7(1):1-16.

Borges A, Tsai SM, Caldas DGG. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant cell reports* 2012;31(5):827-38.

Boubakri H, Wahab MA, Chong J, Bertsch C, Mliki A, Soustre-Gacougnolle I. Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death. *Plant Physiol Biochem* 2012;57:120-33.

Brun GR, Mossi AJ. Caracterização química e Atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). *Perspectiva* 2010;34(127):135-42.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94(3):223-53.

Campanhola C. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna:Embrapa Meio Ambiente, 2003.

Celli GB, Pereira-Netto AB, Beta T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Res Int* 2011;44(8):2442-51.

Chen Q, Xu S, Wu T, Guo J, Sha S, Zheng X, et al. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. *J Sci Food Agric* 2014;94:2441-47.

Coelho de Souza G, Haas APS, Von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* 2004;90(1):135-43.

Coman C, Moț AC, Gal E, Pârvu M, Silaghi-Dumitrescu R. Laccase is upregulated via stress pathways in the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol* 2013;117(7):528-39.

Consolini AE, Baldini OA, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. *J Ethnopharmacol* 1999;66(1):33-9.

Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. J Ethnopharmacol 2002;81(1):57-63.

Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. Lett Appl Microbiol 1999;29(2):130-35.

Costa EMD, Pimenta FC, Luz C, Oliveira VD, Oliveira M, Bueno E, et al. *Beauveria bassiana*: quercetinase production and genetic diversity. Braz J Microbiol 2011;42(1):12-21.

Coutinho HD, Costa JG, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. J Med Food 2010;13(4):1024-26.

Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press; 1981.

Da Costa DP. Influência do biótipo de cor de fruto e da sazonalidade no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Goiás; 2009.

De Lorenzo G, Cervone F. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs): Their role in specificity and defense against pathogenic fungi. in: Plant-Microbe Interactions. 3. ed. New York:Chapman & Hall;1997. p. 76-93.

Domingues RJ, Souza JDF, Tófoli JG, Matheus DR. Ação "*in vitro*" de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. Arq Inst Biol (Sao Paulo) 2009;76(4):643-49.

Duangmal K, Owusu Apenten RK. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chem 1999;64(3):351-59.

Edris AE, Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. Food/Nahrung 2003;47(2):117-21.

Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson KEL. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett* 1996;391(1):144-48.

El Hadrami A, Adam LR, Daayf F. Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing antimicrobial metabolites. *Mol Plant Microbe Interact* 2011;24(3):328-35.

Erlund, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 2004;24(10):851-74.

Fiuza TS, Rezende MH, Sabóia-Morais SM, Bara MTF, Tresvenzol LM, Paula JR. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Rev Eletr Farm* 2008;5(2):01-11.

Galhiane MS, Rissato SR, Chierice GO, Almeida MV, Silva LC. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. *Talanta* 2006;70(2):286-92.

Garcia RÁ, Juliatti FC, Barbosa KAG, Cassemiro TA. Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal* 2012;28(1):48-57.

Görge CA, Silveira Neto AD, Carneiro LC, Ragagnin V, Lobo Junior M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 2009;44(12):1583-90.

Guo ZJ, Miyoshi H, Komyoji T, Haga T, Fujita T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1991;1056(1): 89-92.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.

Hegedus DD, Rimmer SR. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen?. *FEMS Microbiol Lett* 2005;251(2):177-184.

Hoffmann-Ribani R, Huber LS, Rodriguez-Amaya DB. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *J Food Compost Anal* 2009;22(4):263-68.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2002;97(7):1027-31.

Hund HK, Breuer J, Lingens F, Hüttermann J, Kappl R, Fetzner S. Flavonol 2, 4-dioxygenase from *Aspergillus niger* DSM 821, a type 2 Cull-containing glycoprotein. Eur J Biochem 1999;263(3):871-78.

Itako AT, Schwan-Estrada KR, Tolentino Júnior JB, Stangarlin JR, Cruz MES. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. Trop Plant Pathol 2008;33(3):241-44.

Kachroo A, Robin GP. Systemic signaling during plant defense. Curr Opin Plant Biol 2013;16(4):527-33.

Kim HJ, Chen C, Kabbage M, Dickman MB. Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. Appl Environ Microbiol 2011;77(21):7721-29.

Laird K, Phillips C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. Lett Appl Microbiol 2012;54(3):169-74.

Lebeda A, Luhoval, Sedlarova M, Jancova D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions – Review. Z. Pflanzenk. Pflanzens. J Plant Dis Prot 2001;108:89-111.

Lee MH, Nishimoto S, Yang LL, Yen KY, Hatano T, Yoshida T, et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora* Phytochemistry 1997;44(7):1343-49.

Leite RDC, Brighenti AM, Castro CD. Girassol no Brasil. Londrina: Embrapa Soja; 2005.

Leonowicz A, Grzywnowicz K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme Microb Technol 1981;3(1):55-58.

Liu X, Wang LP, Li YC, Li HY, Yu T, Zheng XD. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. J Appl Microbiol 2009;107(5):1450-56.

Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 2001;25(4):402-408.

Lobo Junior M, Geraldine A, Carvalho D, Cobucci T. Uso de cultivares de feijão comum com arquitetura ereta e ciclo precoce para escape do mofo branco. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009.

Lunardi I, Peixoto JL, Silva CCD, Shuquel IT, Basso EA, Vidotti GJ. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. J Braz Chem Soc 2001;12(2):180-83.

Lusso MFG, Pascholati SF. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. Summa Phytopathol 1999;25(3):244-49.

Magina MD, Dalmarco EM, Wisniewski Jr A, Simionatto EL, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia species*. J Nat Med 2009;63(3):345-50.

Maia JGS, Andrade EHA, Da Silva MHL, Zoghbi MGB. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. J Essent Oil Res 1999;11(6):727-29.

McMaster CA, Plummer KM, Porter IJ, Donald EC. Antimicrobial activity of essential oils and pure oil compounds against soilborne pathogens of vegetables. Australas Plant Pathol 2013;42(4):385-92.

Meireles E, Vieira E, Silva S, Vieira E, Rava C. Clima e produção de sementes. In: Sementes de feijão: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2000. p. 53-63.

Melo RM, Corrêa VC, Amorim ACL, Miranda ALP, Rezende CM. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. J Braz Chem Soc 2007;18(1):179-83.

Merkens H, Sielker S, Rose K, Fetzner S. A new monocupin quercetinase of *Streptomyces* sp. FLA: identification and heterologous expression of the *queD* gene

and activity of the recombinant enzyme towards different flavonols. Arch Microbiol 2007;187(6):475-87.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31(3):426-28.

Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. Int J Aromather 2005;15(3):147-152.

Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). Bioorg Med Chem Lett 1993;3(2):225-30.

Ojaghian MR, Chen Y, Chen S, Cui ZQ, Xie GL, Zhang J. Antifungal and enzymatic evaluation of plant crude extracts derived from cinnamon and rosemary against *Sclerotinia carrot* rot. Ann Appl Biol 2014;164(3):415-29.

Parveen M, Hasan MK, Takahashi J, Murata Y, Kitagawa E, Kodama O, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. J Antimicrob Chemother 2004;54(1):46-55.

Pârvu M, Pârvu AE, Barbu-Tudoran L, Roșca-Casian O, Vlase L, Danciu MR, et al. In vitro effects of *Allium obliquum* extract on the growth and ultrastructure of *Botrytis paeoniae*. J Med Plant Res. 2013;7(17):1138-45.

Pedras MSC, Ahiahonu PW. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. Phytochemistry 2005;66(4):391-411.

Peixoto CA, Oliveira AL, Cabral FA. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves. J Food Process Eng 2010;33(5):848-60.

Pharmacopoeia B. HM Stationary office. London: PA; 1980.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000;63(7):1035-42.

Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Šolmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochem Biophys Res Commun 2003;306(2):530-36.

Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control* 2006;17(5):359-64.

Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem* 2008;109(4):883-90.

Rocha OC, Guerra AF, De Azevedo HM. Ajuste do modelo Chistiansen-Hargreaves para estimativa da evapotranspiração do feijão no Cerrado. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 2003;7(2):263-68.

Rodrigues E, Schwan-Estrada KRF, Fiori-Tutida ACG, Stangarlin JR, Cruz MES. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. *Summa Phytopathol* 2007;33(2):124-28

Rollins JA, Dickman MB. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(1):75-81.

Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 2005;225(1-2):57-65.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1996;8(10):1809-19.

Sang MK, Kim KD. Biocontrol activity and primed systemic resistance by compost water extracts against anthracoses of pepper and cucumber. *Phytopathology* 2011;101(6):732-40.

Sangeetha G, Thangavelu R, Usha Rani S, Muthukumar A. Antimicrobial activity of medicinal plants and induction of defense related compounds in banana fruits cv. Robusta against crown rot pathogens. *Biol Control* 2013;64(1):16-25.

Sattler S, Funnell-Harris D. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Front Plant Sci* 2013;4:70.

Savary S, Teng PS, Willocouet L, Nutter FW. Quantification and Modeling of Crop Losses: a Review of Purposes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2006;44: 89-112.

Schapoval EES, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J Ethnopharmacol* 1994;44(3):137-42.

Schwartz HF, Steadman JR, Harveson RM. White mold of dry beans. Colorado State:University Cooperative Extension 1989.

Sexton AC, Minic Z, Cozijnsen AJ, Pedras MSC, Howlett BJ. Cloning, purification and characterisation of brassinin glucosyltransferase, a phytoalexin-detoxifying enzyme from the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genet Biol* 2009;46(2):201-09.

Shao X, Cheng S, Wang H, Yu D, Mungai C. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *J Appl Microbiol*, 2013;114(6):1642-49.

Siddiqui Y, Meon S, Ismail MR, Ali A. *Trichoderma*-fortified compost extracts for the control of choanephora wet rot in okra production. *Crop Prot* 2008;27(3):385-90.

Silva BDS, Ulhoa CJ, Batista KA, Di Medeiros MC, Yamashita F, Fernandes KF. Biodegradable and bioactive CGP/PVA film for fungal growth inhibition. *Carbohydr Polym* 2012;89(3):964-70.

Silva JC, Oliveira RD, Jham GN, Aguiar ND. Effect of neem seed extracts on the development of the soybean cysts nematode. *Trop Plant Pathol* 2008;33(3):171-79.

Sindhan GS, Hooda I, Parashar RD. Evaluation of plant extracts for the control of powdery mildew of pea. *Indian J Mycol Plant Pathol* 1999;29(2):257-58.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* 2002;15(1):71-81.

Soylu EM, Kurt Ş, Soyly S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int J Food Microbiol* 2010;143(3):183-89.

Soylu EM, Soylu S, Kurt S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia 2006;161(2):119-28.

Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM, Kurt Ş. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. J Appl Microbiol 2007;103(4):1021-30.

Stasi LD Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. Universidade Estadual Paulista: São Paulo; 1996.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JM, Saraiva JA, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Ind Crops Prod 2013;43:587-95.

Tranchimand S, Tron T, Gaudin C, Iacazio G. Evaluation of phenolics and sugars as inducers of quercetinase activity in *Penicillium olsonii*. FEMS Microbiol Lett 2005;253(2):289-94.

Van den Dool H, Dec Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chromatogr A 1963;11(2):463-71.

Van Loon LC. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur J Plant Pathol 1997;103(9):753-65.

Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol Mol Plant Pathol 1999;55(2):85-97.

Williams CN, Chew WY, Rajaratnam JH. Tree and field crops of the wetter regions of the tropics. Harlow:Longman Group Ltd.; 1979.

Xin Z, Yu Z, Erb M, Turlings TC, Wang B, Qi J, et al. The broad-leaf herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. New Phytol 2012;194(2):498-510.

Yorinori JT, Ribeiro do Vale FX, Zambolim L. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill): controle de doenças. Controle de doenças de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p. 953-1009.

Zhu JX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J Ethnopharmacol* 2004;93(1):133-40.

Zucker M Induction of phenylalanine ammonia-lyase in *Xanthium* leaf disks. Photosynthetic requirement and effect of daylength. *Plant physiology* 1969;44(6):912-22.