

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

Extratos vegetais no controle da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

IONE MEDEIROS DA SILVA

**Manaus – AM
2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

IONE MEDEIROS DA SILVA

Extratos vegetais no controle da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e Ferreira

Manaus – AM
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, Ione Medeiros da
Extratos vegetais no controle da antracnose em cebolinha / Ione Medeiros da Silva. 2019
59 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes
Coorientadora: Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e Ferreira
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Controle alternativo. 2. Extrato vegetal. 3. Colletotrichum spaethianum. 4. Fitopatógeno. I. Bentes, Jânia Lília da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

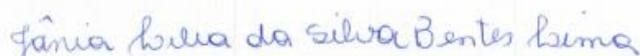
IONE MEDEIROS DA SILVA

EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE
(*Colletotrichum* spp.) EM CEBOLINHA (*Allium fistulosum* L.)

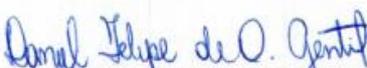
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Profa. Dra. Liane Cristine Rebouças Demosthenes, Membro
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dr. Daniel Felipe de Oliveira Gentil, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICO

Lucimar Medeiros da Silva e Francisco Lima e Silva, meus pais, por seu apoio incondicional e por acreditarem em mim; aos meus irmãos, pela compreensão, nos momentos em que não estive presente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, nos momentos em que desanimei.

Aos meus pais Lucimar Medeiros da Silva e Francisco Lima e Silva, por todo apoio recebido, ao longo dessa jornada.

Aos meus irmãos, por estarem ao meu lado, nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos de coração, Kirk Renato Soares e Eduardo Antônio Neves dos Santos, pela ajuda e incentivo, quando eu não acreditava mais que iria conseguir.

Aos colegas de Laboratório, pela ajuda, quando o cansaço físico, tomara conta de mim.

Às Professoras Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima, Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza e Dra. Ana Francisca T.A.F e Ferreira pela paciência e dedicação.

Aos técnicos Antônio, Macir e Franky, pela ajuda com as atividades na casa de vegetação.

A essa banca, pelo tempo dedicado com a leitura da Dissertação e por aceitarem o convite para minha Defesa.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

A cebolinha, é uma hortaliça bastante conhecida e utilizada pela população brasileira. Durante o seu cultivo, as plantas ficam expostas a doenças causadas por fungos e bactérias. Dentre as doenças de origem fúngica, destaca-se a antracnose, causada por fitopatógeno do gênero *Colletotrichum*, de fácil disseminação e sobrevivendo parasitando vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os extratos, obtidos a partir das plantas *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans*, no controle de antracnose da cebolinha. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e em casa de vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, onde foram realizadas caracterização morfológica e identificação molecular de *Colletotrichum* sp. associados à antracnose da cebolinha; obtenção e avaliação dos (EBA) Extratos Brutos Aquosos; obtenção e avaliação das frações hexânicas, acetato-etílicas e metanólicas dos extratos vegetais; avaliação do efeito dos extratos fracionados no crescimento micelial (ICM) e Porcentagem de Inibição de Esporulação (PIE). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando constatada significância, por intermédio do teste F, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. No ensaio *in vitro* com o extrato bruto aquoso (EBA), o menor valor de ICM foi obtido com os tratamentos *Piper marginatum* e *Picrolema sprucei*. Quanto a PIE, o maior valor foi obtido a concentração de 50%, sendo que o EBA de *Croton cajucara* apresentou maior inibição da esporulação do fitopatógeno. Já para o ensaio *in vitro* com os extratos fracionados, o menor valor de ICM foi obtido com a fração acetílica de *Curcuma longa*. Quanto a PIE, o maior valor, foi obtido com a fração metanólica de *Picrolema sprucei*. No ensaio *in vivo*, os extratos de *Piper marginatum* e *Picrolema sprucei* apresentaram melhor desempenho no controle da severidade da doença.

Palavras Chave: *Colletotrichum* sp., controle alternativo.

ABSTRACT

The chives, is a vegetable well known and used by the Brazilian population. During their cultivation, plants are exposed to diseases caused by fungi and bacteria. Among the diseases of fungal origin, the anthracnose, caused by phytopathogen of the genus *Colletotrichum*, of easy dissemination and surviving parasitizing vegetables stands out. The objective of this work was to evaluate the extracts obtained from the plants *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* and *Laportea aestuans*, in the control of anthracnose of chives. The experiment was carried out in the Laboratory of Microbiology and Phytopathology and in a greenhouse of the Faculty of Agrarian Sciences, Federal University of Amazonas, where morphological characterization and molecular identification of *Colletotrichum* sp. associated with anthracnose of chives; Obtaining and Evaluating (EBA) Aqueous Crude Extracts; obtaining and evaluating the hexane, acetate-ethylic and methanolic fractions of plant extracts; evaluation of the effect of fractionated extracts on mycelial growth (ICM) and Esporulation Inhibition Percentage (PIE). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA), when the significance was verified, through the F test, the means were compared by the Tukey test at the 5% probability level. In the in vitro test with crude aqueous extract (EBA), the lowest ICM value was obtained with the treatments *Piper marginatum* and *Picrolema sprucei*. As for PIE, the highest value was obtained at a concentration of 50%, and the EBA of *Croton cajucara* presented greater inhibition of sporulation of the phytopathogen. As for the in vitro assay with fractionated extracts, the lowest ICM value was obtained with the acetylic fraction of *Curcuma longa*. As for PIE, the highest value was obtained with the methanolic fraction of *Picrolema sprucei*. In the in vivo assay, the extracts of *P. marginatum* and *Picrolema sprucei* showed better performance in controlling the severity of the disease.

Key words: *Colletotrichum* sp., alternative control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto morfológico de *Colletotrichum* sp. associado a antracnose em plantas de cebolinha. A) Colônia de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). B) Conídios de formato falciforme. C) Apressórios melanizados originados de hifas.....31

Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies de *Colletotrichum* construída da concatenação das regiões genômicas parciais do espaçador interno transcrito rDNA (ITS), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina(TUB2). Os valores de bootstrap são indicados na árvore. Isolados com o código Ufam foram usados no presente trabalho.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de crescimento micelial (ICM) e porcentagem de inibição de esporulação (PIE) de *Colletotrichum spaethianum* cultivado em meio contendo diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), cróton (*Croton cajucara*), piper (*Piper marginatum*), caferana (*Picrolema sprucei*) e urtiga (*Laportea aestuans*).....33

Tabela 2. Índice de crescimento micelial (ICM) e porcentagem de inibição de esporulação (PIE) de *Colletotrichum spaethianum* cultivado em meio contendo frações hexânica, acetato etílico e metanólica de cúrcuma (*Curcuma longa*), cróton (*Croton cajucara*), piper (*Piper marginatum*), caferana (*Picrolema sprucei*) e urtiga (*Laportea aestuans*).....37

Tabela 3. Severidade da antracnose (*Colletotrichum spaethianum*) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de cebolinha (*Allium fistulosum*) tratadas com extrato bruto aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), cróton (*Croton cajucara*), piper (*Piper marginatum*), caferana (*Picrolema sprucei*) e urtiga (*Laportea aestuans*).....41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
GERAL	14
ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA CEBOLINHA.....	15
3.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS DA CULTURA DA CEBOLINHA	16
3.3 MANEJO ALTERNATIVO DE FITOPATÓGENOS ATRAVÉS DO USO DE EXTRATOS VEGETAIS	17
3.4 ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS COMO BIOFUNGICIDAS	19
3.4.1 <i>Picrolema sprucei</i> Hook.f.	19
3.4.2 <i>Piper marginatum</i> Jacq.(capeba)	19
3.4.3 <i>Croton cajucara</i> Benth. (sacaca)	20
3.4.4 <i>Curcuma longa</i> L.	21
3.4.5 <i>Laportea aestuans</i> (Gaud)	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Obtenção dos isolados, culturas monospóricas e preservação dos isolados	22
4.2. Caracterização morfológica e identificação molecular de <i>Colletotrichum</i> sp. associado à antracnose da cebolinha.....	23
4.2.1 Identificação molecular	24
Extração de DNA para identificação da espécie	24
PCR e Sequenciamento	24
Edição das sequências e análises filogenéticas	25
4.3. Avaliação dos (EBA) de <i>Picrolema sprucei</i>, <i>Piper marginatum</i>, <i>Croton cajucara</i>, <i>Curcuma longa</i> e <i>Laportea aestuans</i> no crescimento micelial e produção de conídios em isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.	25
4.4. Obtenção dos extratos vegetais fracionados, avaliação do efeito dos extratos vegetais fracionados no crescimento micelial e na produção de esporos de <i>Colletotrichum</i> sp.....	27
4.5. Avaliação do extrato bruto aquoso (EBA) de <i>Picrolema sprucei</i>, <i>Piper marginatum</i>, <i>Croton cajucara</i>, <i>Curcuma longa</i> e <i>Laportea aestuans</i> na severidade da antracnose em plantas de cebolinha	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.	31

5.2 Efeito dos (EBA) de <i>Picrolema sprucei</i>, <i>Piper marginatum</i>, <i>Croton cajucara</i>, <i>Curcuma longa</i> e <i>Laportea aestuans</i> no crescimento micelial e produção de conídios em isolados de <i>Colletotrichum spaethianum</i>.....	34
5.3 Efeito dos extratos fracionados de <i>Picrolema sprucei</i> , <i>Piper marginatum</i> , <i>Croton cajucara</i> , <i>Curcuma longa</i> e <i>Laportea aestuans</i> sobre o crescimento micelial e produção de conídios de <i>Colletotrichum spaethianum</i>	37
5.4 Efeito dos extratos vegetais de <i>Picrolema sprucei</i> , <i>Piper marginatum</i> , <i>Croton cajucara</i> , <i>Curcuma longa</i> e <i>Laportea aestuans</i> na severidade da antracnose em plantas de cebolinhas.....	41
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A cebolinha (*Allium fistulosum* L.) é uma hortaliça amplamente conhecida e aceita pela população brasileira, utilizada como condimento no preparo de alimentos, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (SOUZA et al., 2015).

Por se tratar de uma hortaliça de fácil cultivo, a cebolinha em grande parte ainda é cultivada de forma tradicional, em canteiros a céu aberto e em casas de vegetação. As altas temperaturas associadas a alta umidade relativa do ar são fatores favoráveis à disseminação de diversos fitopatógenos, em plantas cultivadas, no estado do Amazonas. Dessa forma, as plantas ficam expostas a diversos fatores bióticos e abióticos (CARDOSO e BERNI, 2012) e pode ser afetada por doenças causadas por fungos e bactérias, que podem ser limitantes ao cultivo se medidas de controle adequadas não forem adotadas.

Dentre as doenças de origem fúngica, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., que é um fitopatógeno de fácil disseminação, sobrevive parasitando vegetais ou como saprófita (SANTANA et al., 2016). A doença apresenta como principal sintoma manchas necróticas pardas que se estendem ao longo de toda a folha (SANTANA et al., 2016). Apesar de ocorrer em todo o mundo, sua maior severidade é registrada nas regiões tropicais e subtropicais, devido as temperaturas elevadas e alta umidade relativa do ar, que são condições favoráveis ao desenvolvimento do fitopatógeno, limitando o cultivo de diversas culturas.

Embora o uso de fungicidas seja a opção mais comum e, geralmente eficiente, no controle de doenças na agricultura, o uso incorreto destes produtos pode favorecer a seleção de variantes resistentes, ter efeito nocivo na saúde humana devido à alta toxicidade, período longo de degradação, e eventual poluição ambiental (SILVA et al., 2017; TRIACA et al., 2018). A busca por produtos naturais que diminua o uso de fungicidas químicos surge como uma alternativa para a mitigação desses problemas, visando um sistema agrícola sustentável.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os extratos vegetais obtidos a partir das plantas *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* no controle de antracnose da cebolinha.

2. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito dos extratos de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* no manejo da antracnose da cebolinha.

ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do extrato vegetal bruto e fracionado de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* no desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. *in vitro*.

Avaliar o efeito dos extratos vegetais brutos na severidade dos sintomas da antracnose da cebolinha *in vivo*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA CEBOLINHA

A cebolinha comum (*Allium fistulosum*, L.), originária da Ásia, é um condimento muito apreciado pela população brasileira. As plantas dessa espécie são bianuais, apresentam folhas cilíndricas e fistulosas, com 0,30 a 0,50 m de altura e coloração verde-escura.

A espécie produz pequeno bulbo cônico, envolvido por película rósea, com perfilhamento e formação de touceira, sua propagação pode ser feita por sementes, ou por divisão de touceiras (bulbinhos), adapta-se a uma ampla faixa de temperaturas, amenas em torno de 25° C ou altas, em torno de 40° C, com cultivares adaptadas aos trópicos. Apresenta melhor produção em solos com pH entre 6,0 a 6,5. A cultivar tradicional no estado do Amazonas de *A. fistulosum* é a “Todo Ano” Nebuka, com coloração verde-clara e boa capacidade de perfilhamento. (FILGUEIRA, 2013).

A cebolinha é uma cultura importante que contribui para a qualidade de vida dos agricultores, uma vez, que o envolvimento da mão-de-obra familiar proporciona uma condição para sustentabilidade na propriedade (FERREIRA e CASIMIRO, 2011).

De acordo com o Idam (2017) no estado do Amazonas foram produzidos 273.577,40 mil maços de cebolinha da cultivar Todo Ano, em 256,94 hectares com uma produção equivalente a 68,394 ton.ha⁻¹, sendo cultivada principalmente por agricultores familiares. Quanto a comercialização, é vendida principalmente em maços pelos supermercados e feiras locais.

No município de Manaus, foi registrada a produção equivalente a 30.000,00 maços de cebolinha em uma área estimada em 50 hectares e no município de Iranduba a produção equivalente a 75.000,00 maços em uma área estimada em 125 hectares (IDAM, 2017).

As cultivares de cebolinha comercializadas são Nebuka Todo Ano, preferida pelos agricultores familiares da região por possuir boa capacidade de perfilhamento, e Natsuyo. Existem relatos feitos por agricultores familiares da horta, que essa cultivar possui curto tempo de prateleira, o que diminui sua preferência por agricultores locais (área produtora de hortaliças folhosas de Manaus-Am, Comunidade Nova Esperança, bairro Valparaíso).

3.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS DA CULTURA DA CEBOLINHA

A produção de cebolinha é afetada por doenças de diferentes etiologias como fungos e bactérias, dentre estas destacam-se a alternariose, também conhecida por Mancha-púrpura causada pelo fungo *Alternaria porri* (Ellis) Cif., o fungo prefere condições de altas temperaturas e alta umidade relativa do ar, sendo uma doença amplamente disseminada, que causa perdas severas em Aliaceas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, ocasionando necrose em suas folhas fistulosas.

A alternariose apresenta como principal sintoma manchas de coloração púrpura delimitadas em formato de olho-de-pombo, nas folhas de espécies do gênero *Allium*, tais como *A. cepa* (cebola), *A. sativum* (alho) e *A. fistulosum* (cebolinha) (WORDELL FILHO et al., 2006). Os métodos empregados no controle da alternariose da cebolinha são o corte baixo e a eliminação dos restos culturais doentes (PEREIRA e HOMECHIN, 1996).

Halfeld et al. 2008 relatam a ocorrência da podridão mole da cebolinha, causada pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, apresenta como principais sintomas exsudação bacteriana na região entre o tecido lesionado e sadio.

A antracnose da cebolinha é ocasionada pelo fungo *Colletotrichum* sp. que pertence ao filo dos Ascomycetos, sua reprodução é dividida em duas fases, a fase sexual, teleomorfa, onde o fungo é denominado de *Glomerella* sp. e as estruturas reprodutivas são os conídios e hifas. Já na fase assexual, ou anamorfa, o fungo recebe a denominação de Coelomyceto e suas estruturas reprodutivas são os ascósporos.

A doença apresenta como principal sintoma manchas necróticas pardas que se estendem ao longo de suas folhas fistulosas. Essas lesões apresentam pequenos corpos de frutificação, os acérvulos, desenvolvidos em anéis concêntricos, referentes aos corpos de frutificação do fungo. As plantas secam completamene, à medida que a doença evolui Santana et al (2016).

No estado do Amazonas o fungo *Colletotrichum* associado à cebolinha, foi descrito pela primeira vez como *Colletotrichum* sp, por Lourd (1993), no município do Careiro. E como *Colletotrichum spaethianum* (Allesch.), por Santana et al (2016) como *C. theobromicola* (Delacroix) e *C. truncatum* (Schwein.), por Matos et al (2017), sendo possível a ocorrência de mais de uma espécie do fungo associada à esta doença.

A consulta ao sistema Agrofit revelou que não há fungicida registrado para antracnose em cebolinha Agrofit (2017), mesmo assim, há relatos de agricultores familiares

que fazem uso do fungicida Dithane por conta própria na tentativa de controle da doença (área produtora de hortaliças folhosas de Manaus-AM, Comunidade Nova Esperança, bairro Valparaíso).

3.3 MANEJO ALTERNATIVO DE FITOPATÓGENOS ATRAVÉS DO USO DE EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais obtidos a partir das plantas aromáticas ou medicinais exercem ação antimicrobiana, agindo diretamente sobre o patógeno, por possuírem compostos bioativos que exercem ação fungistática, inibem o crescimento micelial e a germinação dos conídios. Já a ativação dos mecanismos de defesa das plantas é proporcionada através dos metabólitos secundários, que ativam a rota metabólica das plantas hospedeiras a produzirem todos os mecanismos de defesa, inclusive, as fitoalexinas (SCHWANESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2008; STANGARLIN et al., 2008).

Essa ação ativadora de mecanismos de defesa foi verificada por Moura et al. (2014), ao avaliarem a atividade indutora de fitoalexinas e a propriedade antifúngica do hidrolato que é o líquido resultante da extração de (*Baccharis trimera*), a diferentes concentrações sobre a germinação de esporos de *Pseudocercospora vitis*, *Cercospora kaki* e *Hemileia vastatrix*. A atividade indutora de fitoalexinas foi avaliada em mesocótilo de sorgo e em colilédones de soja. A atividade antifúngica foi avaliada sobre a germinação de esporos de *Pseudocercospora vitis*, *Cercospora kaki* e *Hemileia vastatrix*. O hidrolato não induziu a produção de fitoalexinas em soja, mas promoveu esta atividade em sorgo a partir da concentração de 50%.

Reis et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica dos extratos aquosos e das frações diclorometânicos e metanólicos de *Duroia macrophylla* e *Duroia saccifera*, coletada na reserva florestal A. Ducke, em Manaus, AM, a partir da coleta das plantas foram preparados extratos aquosos e diclorometânicos metanólicos. Quanto a planta *D. saccifera*, o extrato diclorometânico dos galhos foi o mais ativo frente as espécies fúngicas. Já os extratos metanólicos e diclorometânico das folhas de *D. macrophylla* foram os mais ativos contra *Candida* sp.

A ação fungistática de extratos vegetais foi constatada com a pesquisa de Andrade et al. (2018) realizaram a análise fitoquímica de cascas de *Byrsonima crassifolia* e avaliaram seu potencial antifúngico do extrato etanólico sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. As concentrações de 800 e 1600 inibiram 38% o crescimento

micelial de *F. solani*, para *S. sclerotiorum* a melhor concentração foi de 2400 µg, reduzindo 37,5%. O potencial antifúngico atribuído a casca da planta após a análise fitoquímica é atribuído a compostos fenólicos e derivados de triterpenos.

Souza et al. (2017) avaliaram o efeito dos extratos vegetais contra *Lasiodiplodia theobrome*. Foi avaliado o crescimento micelial do patógeno pelo método de difusão em ágar *in vitro*. Os extratos vegetais foram testados nas concentrações de 10, 20 e 30%. Para avaliação do efeito direto dos extratos de Angico, Umburana e Quebra-faca sobre o crescimento de *Lasiodiplodia theobrome*. Foi utilizada como testemunha (ADE) água destilada esterilizada. No ensaio em casa de vegetação, para avaliar os extratos vegetais como indutores de resistência cachos de videira da cultivar Itália foram submetidos aos mesmos tratamentos e inoculados após quatro horas com *Lasiodiplodia theobrome*. Os resultados mostraram que os extratos de *Anadenanthera macrocarpa* e *Commiphora leptophloeos* nas concentrações de 30%, inibiram o crescimento micelial *in vitro* em 61,66% e 60% respectivamente. Portanto, os extratos testados não foram eficientes em inibir a incidência e a severidade da doença.

A cebolinha também pode ser utilizada como espécie vegetal que proporcione ação antimicrobiana. Na pesquisa de Mostafa et al. (2018), seu composto bioativo foi revelado como saponina, isolaram alliopiroside, composto de saponina em *Allium fistulosum* e seu papel no mecanismo de defesa contra *Fusarium oxisporum*. Para obterem uma visão molecular da via de biossíntese da saponina de *Allium* foi sequenciado o RNA de alto rendimento da raiz, bulbo e folha de *Allium fistulosum*. Uma compreensão dos compostos de saponina e genes relacionados com a biossíntese facilitaria o desenvolvimento de plantas com conteúdo único de saponinas e mais resistência a doenças.

Chang et al. (2016) avaliaram as atividades antibacterianas, de todas as partes de *Allium fistulosum*, extraídas a partir do vinho de arroz. Os resultados mostraram que os extratos comerciais de vinho de arroz e *Allium fistulosum* continham 28,3 – 95,9 µL/mL de alcina e exibiram atividade antibacterianas significativas. As atividades antibacterianas foram testadas contra quatro bactérias, através do teste de difusão em ágar. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4 ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS COMO BIOFUNGICIDAS

3.4.1 *Picrolema sprucei* Hook.f

A espécie *Picrolema sprucei* Hook.f, conhecida popularmente como Caferana é pertencente a simaroubaceae. Sendo uma planta originária da América tropical, (SIMÃO et al., 1991; SARAIVA et al., 2002). A espécie caracteriza-se pelo conteúdo de substâncias amargas, responsáveis por suas propriedades medicinais (FERNANDO e QUINN, 1992; MUHAMMAD et al., 2004).

Devido a diversidade fitoquímica da Caferana, ela pode ser caracterizada como uma fonte promissora de moléculas bioativas com potencial para ser usada na pesquisa. Desde quando a primeira estrutura quassinóide foi isolada, em 1961, o crescente interesse em espécies da família simaroubaceae somente aumentou e resultou no isolamento e identificação de mais de 200 quassinóides atualmente conhecidos (CURCINO VIEIRA e BRAZ-FILHO, 2006).

A Caferana é usada tradicionalmente para o tratamento da malária e como inseticida (SIMÃO et al., 1991; ARRIAGA et al., 2002; MUHAMMAD et al., 2004; SARAIVA et al., 2006; SILVA et al., 2010). Ainda não existe trabalho que comprove a ação antimicrobiana do quassinóide composto bioativo da Caferana, com resultado significativo.

3.4.2 *Piper marginatum* Jacq.(capeba)

A espécie *Piper marginatum* (capeba) é pertencente a Piperaceae, sendo uma planta amplamente distribuída em toda a América do Sul. Estudos fitoquímicos com espécies de *Piper* revelaram uma grande diversidade de metabólitos secundários, com ação antifúngica (REIGADA et al., 2007; JOHNNY et al., 2011).

A ação antifúngica dos metabólitos secundários de *Piper marginatum* vem sendo comprovada com pesquisas desenvolvidas com a espécie. Johnny et al. (2011) avaliaram diferentes espécies vegetais e verificaram que o extrato bruto de folhas de *P. betle*, a doses muito baixas (0,01 µg mL⁻¹), apresentou maior atividade antifúngica na inibição do crescimento micelial de *C. capsici*, agente causal da antracnose do pimentão. Para os autores os metabólitos secundários afetam de forma distinta os diversos fitopatógenos.

Sanchez et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Piper marginatum* contra microorganismos de importância no meio agrícola. O óleo essencial foi

obtido por hidrodestilação, utilizando-se o equipamento de Clevenger. O rendimento do seu óleo essencial foi determinado e sua composição química foi revelada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O efeito antifúngico do óleo foi testado contra *Alternaria solani*. Seu óleo essencial é constituído por compostos oxigenados e dentro deles os principais componentes são isosofrol e notosmirnol. O óleo apresentou efeito fungistático contra *Alternaria solani*.

Para Araújo et al. (2014) o extrato metanólico obtido da folha de *P. marginatum* coletada em Pernambuco, Brasil, foi avaliado quanto à atividade antifúngica contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum scovillei*, que causa antracnose no pimentão. O extrato metanólico apresentou uma inibição dose-dependente do crescimento micelial, alcançando 50% de inibição com uma concentração de 750 µg / mL. Embora o extrato metanólico tenha sido fracionado por cromatografia em coluna e uma fração significativamente ativa foi separada, os compostos antifúngicos ativos ainda precisam ser identificados.

3.4.3 *Croton cajucara* Benth. (sacaca)

Croton cajucara, pertencente a euphorbiaceae tem sido uma importante planta medicinal tradicional no Brasil. Ocorre amplamente na região da floresta amazônica brasileira, onde é popularmente conhecida como "sacaca". (HIRUMA et al., 2007; PERAZZO et al., 2007).

São conhecidos dois morfotipos de *C. cajucara*: "sacaca" branca e "sacaca" vermelha, identificadas principalmente por cor de folhas jovens e vapores (CHAVES et al., 2006). Os óleos essenciais do morfotipo branco são ricos em linalol, enquanto os do morfotipo vermelho são ricos em 7-hidroxicalameneno. O óleo essencial rico em linalol das folhas de *C. cajucara* mostrou ser muito tóxico para *Leishmania amazonensis* e *Candida albicans* (ROSA et al., 2013; ALVIANO et al., 2005).

Azevedo et al. (2013) avaliaram os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas do morfotipo vermelho de *Croton cajucara* contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis*, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus oryzae* os autores constataram que os óleos ricos em 7-hidroxicalameneno apresentaram alta atividade antimicrobiana, com CIM equivalente a $4,76 \times 10^{-3}$ µg / mL para MRSA, 4,88 µg / mL para *M. tuberculosis*, 39,06 µg / mL para *M. smegmatis* e 0,152 µg / mL para *R. oryzae* e $3,63 \times 10^{-8}$ µg / mL para *M. circinelloides*.

Azevedo et al. (2014) isolaram o 7- hidroxicalameneno de *Croton cajucara* com 98% de pureza. A CIM de *Cróton cajucara* contra *Cilindrospora de Absidia*, *Cunninghamella elegans*, *Mucor circinelloides*, *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*, *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Mucor ramosissimus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae* e *Syncephalastrum racemosum* variaram de 19,53 a 2500 µg / mL. Já a medicação de referência anfotericina B, apresentou CIM (Concentração Inibitória Mínima) e equivalente a 0,085 µg / mL a 43,87 µg / mL. O 7- hidroxicalameneno alterou a diferenciação dos esporos e o conteúdo lipídico total. Análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações significativas na estrutura celular de *R. Oryzae*.

3.4.4 *Curcuma longa* L.

A espécie *Curcuma longa* é uma erva perene, pertencente as zingiberaceae possui rizoma espesso e elipsoidovato, com córtex laranja no seu interior, (CHUAKUL, 2000). A planta é conhecida popularmente com o nome de Açafrão, sendo originária da Índia (CHATTOPADHYAY, 2004). A espécie é insolúvel em água e degrada-se sob condições alcalinas e de luz (CHANG e CHEN, 2015).

Gupta et al. (2015) testaram as frações dos rizomas de *Curcuma longa* contra *Staphylococcus aureus*. Observações ao microscópio eletrônico de varredura revelaram que o patógeno tratado com o extrato fracionado de *Curcuma longa* apresentou deformidade morfológica, com ausência parcial da membrana citoplasmática, que leva à ruptura celular. Para os autores, a capacidade dos extratos fracionados inibirem o crescimento do patógeno em teste é um indício do seu amplo espectro potencial antimicrobiano, que pode ser usado no gerenciamento de infecções microbianas.

Almeida et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana da *Curcuma* na forma de pó da curcumina disponível no comércio, dos pigmentos curcuminóides purificados e dos óleos essenciais de *Curcuma longa*. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi determinada pelo método de difusão em ágar. Somente o extrato etanólico da bisdesmetoxicurcumina apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*. Já o óleo essencial da *Curcuma* apresentou atividade antimicrobiana contra o *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger* e *S. cerevisiae*, sendo que essa atividade aumentou em função do aumento da concentração. Os halos de inibição, obtidos com o óleo essencial, foram significativos, quando comparados aos antibióticos, cloranfenicol e anfotericina, mostrando que o óleo essencial da *Curcuma* é um agente antimicrobiano em potencial.

3.4.5 *Laportea aestuans* (Gaud)

A espécie *Laportea aestuans*, pertencente a Urticaceae, possui sinônimos como *Fleurya aestuans* e *Fleurya aestuans*. A planta é uma erva daninha e aparece em cultivos novos e pousio. É uma planta herbácea de 1,5 m de comprimento, difundida nos trópicos africanos e asiáticos. Apresenta como composto bioativo em seu óleo essencial o salicilato de metila, responsável por sua ação antimicrobiana.

Oloyede et al. (2013) isolaram e caracterizaram os compostos bioativos da fração n-hexânica de *L. aestuans*, o ensaio antimicrobiano foi realizado pelo método de difusão em ágar. A AC (Análise Cromatográfica) mostrou 65,23% de inibição a 1 mg/mL, no teste de tiocianato férrico. A AC também inibiu o crescimento microbiano significativamente quando comparado com Tioconazol, que são padrões antifúngicos. A presença do derivado Chrysen-2-ol em *L. aestuans* que não é tóxico e possui atividade antimicrobiana.

Oloyede et al. (2016) determinaram a composição química dos óleos essenciais de *Laportea aestuans* através da cromatografia gasosa para determinar o nível tóxico dos óleos essenciais. Os autores realizaram o teste de letalidade, um bioensaio para a purificação de produtos naturais bioativos. O efeito antimicrobiano foi realizado em outros para estimar o potencial de *Laportea aestuans* contra determinados microorganismos, porque a planta é considerada um agente antimicrobiano eficaz na prática da medicina tradicional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos isolados, culturas monospóricas e preservação dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram obtidos a partir de plantas de cebolinha naturalmente infectadas, com sintomas da antracnose em áreas de cultivo nos municípios de Manaus (3°06'06" S/ e 60°01'29" W) e Iranduba (03°17'05" S/ e 60°11'10" W) no estado do Amazonas. As amostras coletadas foram analisadas no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas.

O isolamento do fungo foi realizado de forma indireta de acordo com Alfenas et al. (2016), onde folhas infectadas foram lavadas em água corrente e com auxílio de um bisturi, sendo obtidos fragmentos foliares de 5 mm² da área de transição entre o tecido lesionado e sadio, os quais foram submetidos à desinfestação superficial em álcool 70%, durante 30

segundos, hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos, seguida de três lavagens em água destilada esterilizada. Os fragmentos foram depositados de forma equidistantes em placas de Petri, contendo meio de cultura AA (17 g de ágar, 1 L de água destilada) e mantidos a temperatura ambiente ($\pm 26^\circ \text{C}$) durante 48 horas. Ao surgirem os primeiros fragmentos de hifa no meio de cultura, estes foram repicados para novas placas contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar: 200 g de batata 17 g de Dextrose e 17 g de Ágar), para a individualização das colônias.

Para obter uniformidade genética, foram obtidas culturas monoconidiais de cada isolado. Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de colônias com dez dias de cultivo, contendo esporulação do patógeno, na qual foi adicionada 50 mL de água destilada esterilizada e com o auxílio de um pincel de cerdas macias foram removidos os esporos da colônia. A solução foi recolhida em um béquer de 50 mL e uma alíquota de 100 μL foi utilizada para realizar a diluição seriada até 10^{-3} , em microtubos contendo 900 μL de água destilada esterilizada. Foi feita a inoculação de 100 μL da suspensão da última diluição em placas contendo meio AA e incubadas em BOD em temperatura de 27°C durante 24-48h. Ao observar a germinação dos conídios no meio de cultura, estes foram repicados para placas contendo meio BDA para o desenvolvimento das colônias monospóricas. Os isolados obtidos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado em incubadora BOD em temperatura de 27°C e preservados pelo método de Castelani (CASTELLANI, 1939).

4.2. Caracterização morfológica e identificação molecular de *Colletotrichum* sp. associado à antracnose da cebolinha

A identificação morfológica de *Colletotrichum* sp. foi baseada no tamanho e no formato de 50 conídios e 50 apressórios de cada isolado, escolhidos aleatoriamente, a partir de colônias com 15 dias de crescimento. Para a caracterização morfológica e morfométrica dos conídios, foi preparada uma suspensão na concentração de 10^5 conídios. mL^{-1} para cada isolado e foram confeccionadas lâminas de microscopia semipermanentes para observação em microscópio óptico Zeiss, sob objetiva de 40 vezes.

Para a caracterização morfométrica dos apressórios foi utilizada a técnica de microcultivo onde, uma alíquota de 100 μL de uma suspensão de esporos na concentração de 10^5 conídios. mL^{-1} , foi depositada sobre cubos de 5 mm^2 de meio ágar água, dispostos em uma placa de Petri previamente esterilizada e forradas com papel de filtro umedecido. O inóculo foi coberto com lamínulas de microscopia, durante 8 dias. A germinação dos

conídios foi interrompida com solução de lactofenol com azul de algodão 1%, e os apressórios foram observados em microscópio óptico Zeiss, sob objetiva de 100 vezes.

As medidas de comprimento e largura de conídios e apressórios foram obtidas através de imagens capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico Zeiss, utilizando o software ZEN (Zeiss®). Os valores de tamanhos e formatos de conídios e apressórios observados foram comparados com as descrições das espécies de *Colletotrichum*, propostas por Damm et al. (2009).

4.2.1 Identificação molecular

Extração de DNA para identificação da espécie

Para a obtenção do DNA genômico, culturas monospóricas dos isolados foram cultivados em erlenmayer de 250 mL contendo meio de cultura BD (Batata-Dextrose), sob agitação contínua a 120 rpm durante cinco dias a ± 26 °C. O micélio produzido foi coletado por filtragem a vácuo em filtro Milipore® com membrana de 0,45 μ m de porosidade, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), e em seguida, foi armazenado à temperatura -4 °C em geladeira, envolvido em papel alumínio, até o momento da extração. O DNA foi extraído utilizando o kit de extração da Zymo Research® de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foi determinada utilizando-se espectrofotômetro (ND – 1000, Nanodrop) e em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 1% e visualizado em transiluminador ultravioleta (UV) usando-se marcador de 50 pb (New England Biolabs). Os DNAs foram ajustados para uma concentração final de 20 ng/mL¹.

PCR e Sequenciamento

Para a identificação molecular dos isolados de *Colletotrichum* foram amplificadas as regiões genômicas parciais do espaçador interno transcrito do rDNA (ITS), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e beta-tubulina (TUB2) (Damm et al. 2009). Os primers utilizados para as ampliações foram ITS3 e ITS4 para região ITS (White et al. 1990), GDF1 e DR1 para GAPDH (Guerber et al. 2003) e BT2Fd + BT4R (Woudenberg et al., 2009) para beta-tubulina. A reação em cadeia de polimerase foi realizada de acordo com o protocolo do kit PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare®) e as condições de cada

corrida foram feitas de acordo com as descritas por Damm et al. (2009; 2012). As reações de PCR foram verificadas em gel de agarose (1,5%) e as bandas foram comparadas com o marcador de peso molecular de 1KB DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) e sequenciados pelo método de Sanger no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da UFAM.

Edição das sequências e análises filogenéticas

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento Sanger foram analisados com o programa SeqAssem® (Hepperle 2004) para obtenção da sequência consenso. As sequências de cada gene foram alinhadas através da função Muscle, implementada no Programa MEGA7 (Kumar, Stecher, e Tamura 2016). Sequências representativas de cada grupo monofilético presentes no trabalho de Damm et al. (2009) foram usadas como material de referência para a construção das árvores filogenéticas, os quais estão depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnological Information).

As filogenias foram construídas a partir de análises individuais dos genes e análise concatenada das 3 regiões gênicas usando os métodos de Máxima verossimilhança (ML) programa MEGA7. O melhor modelo de evolução de nucleotídeos sob o critério de informação de Akaike (AIC) para cada conjunto de dados foi estimado a partir da análise feita no software Model Test 3.7 (Posada 2008). A visualização das árvores filogenéticas foi feita com o software FigTree v1.4.3 disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.

4.3. Avaliação dos (EBA) de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* no crescimento micelial e produção de conídios em isolados de *Colletotrichum sp.*

Foi avaliado o efeito do (EBA) extrato bruto aquoso das folhas de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, rizomas de *Curcuma longa* e as plantas inteiras de *Laportea aestuans*, sobre o crescimento micelial e a inibição da germinação dos esporos de *Colletotrichum sp.*

As espécies vegetais foram coletadas pela manhã, no Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas, (latitude 3° 6' 0,8" S, longitude 59° 58' 26" W). Foram montadas

exsicatas das plantas que apresentaram estruturas reprodutivas e essas estão depositadas sobre número de herbário 11.413 do Instituto de Ciências Biológicas da Ufam.

As espécies vegetais foram selecionadas, obedecendo-se aos critérios da abundância e sanidade, a coleta foi feita durante os meses de dezembro e julho e transportadas ao Laboratório de Fitopatologia da Ufam, onde foram lavadas em água corrente e após perderem o excesso de umidade, foram desidratado em estufa de circulação de ar a 40° C, durante 48 horas. Após desidratadas as espécies vegetais foram trituradas em liquidificador para a obtenção das plantas na forma de pó.

Para o preparo do extrato bruto aquoso (EBA) foram utilizados 100 g de cada espécie vegetal na forma de pó e foi adicionado 1000 mL de água destilada esterilizada, a mistura foi mantida em repouso, ao abrigo da luz envolvido em papel alumínio a temperatura de 27 ° C, durante 48 horas. Após este período, foi realizada a filtragem, em gaze e papel de filtro esterilizados, os extratos foram recolhidos em béqueres e adicionados ao meio de cultura BDA.

Os (EBA) foram adicionados ao meio de cultura BDA, nas concentrações de 10,20,30,40 e 50%, para o preparo da mistura, a concentração de 10%, foi adicionado 10 mL de (EBA), com auxílio de proveta, ao erlemayer com capacidade para 100 mL, mais 90 mL do meio de cultura BDA. Para as demais concentrações, houve mudança na quantidade do (EBA) e do meio de cultura.

A mistura foi autoclavada a 120 ° C, durante 15 min e ao atingir temperatura ambiente, foi vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, ao centro de cada placa foi adicionado um micélio do fitopatógeno de 0,5 cm de diâmetro (CELOTO et al. 2011).

As placas foram incubadas em BOD a 27° C e submetidas a avaliações dos diâmetros das colônias em sentido longitudinal e ortogonal até que um dos tratamentos atingisse todas as bordas da placa, com auxílio de paquímetro digital.

Os experimentos foram montados separadamente para cada espécie vegetal, em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (5 concentrações do EBA) e cinco repetições, sendo cada unidade experimental uma placa de Petri. Como testemunha, foram utilizadas placas contendo somente o meio de cultura BDA e o micélio do fitopatógeno.

Com as medidas dos diâmetros das colônias foi calculado do o índice de crescimento micelial (ICM), de acordo com a fórmula de Salgado et al. (2003).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_N}{N_N},$$

Onde:

ICM = índice de crescimento micelial;

C= crescimento micelial da colônia na primeira, segunda e última avaliação e

N= número de dias necessários para o crescimento micelial atingir a bordas da placa.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e à partir de resultado significativo para o teste F realizou-se o teste de médias e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa Assistat 7.7 Beta.

Imediatamente após o ensaio anterior, foram coletados os esporos das placas nas quais foi avaliado o crescimento micelial, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada às placas e com auxílio de um pincel de cerdas macias, os esporos foram liberados na solução, pipetou-se uma alíquota de 20 µl dessa solução e adicionou-se a lâminas de microscopia semi-permanentes em três gotas para quantificação dos conídios feita pelo método de contagem em gota.

A porcentagem de inibição da esporulação foi obtida pela fórmula: PIE = [(esporulação da testemunha – esporulação do tratamento) / esporulação da testemunha] x 100 (FERNANDES et al, 2015).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e à partir de resultado significativo para o teste F aplicou-se o teste de médias as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa Assistat 7.7 Beta.

4.4. Obtenção dos extratos vegetais fracionados, avaliação do efeito dos extratos vegetais fracionados no crescimento micelial e na produção de esporos de *Colletotrichum* sp.

Os extratos vegetais fracionados foram obtidos utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol, os quais possuem polaridades crescentes. Para o fracionamento, 100 g do material vegetal de cada espécie vegetal seca e triturada foi submetida à maceração em 400 mL de hexano, durante 48 h em capela de exaustão de gases, seguido de filtragem em filtro Milipore® acoplado à bomba de vácuo e armazenado em recipiente estéril e ao abrigo

da luz, envolvido em papel alumínio, a temperatura ambiente, em capela de exaustão de gases.

Ao resíduo remanescente foi adicionado 200 mL de hexano, durante 24 h, quando novamente foi filtrado. Este mesmo procedimento foi repetido para os demais solventes de polaridades crescentes acetato de etila e metanol, com as mesmas 100 g de cada espécie vegetal utilizadas no início do procedimento.

As frações obtidas, no estado líquido, foram rotaevaporadas em rotaevaporador da FISATOM, a 50 rpm à temperatura de 45°C, no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químico (LAEQ) da Central Analítica de Química da Ufam, obtendo-se as frações concentradas denominadas hexânica (FHex), acetato-etílica (FACeT) e metanólica (FMet).

A fração metanólica de *Picrolema sprucei* apresentou maior rendimento em comparação com as demais frações das espécies vegetais.

Extratos fracionados (FHex, FACeT e FMet) de cada espécie vegetal, na proporção de 0,0005 mg, foram dissolvidas em 0,5 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), adicionados ao meio de cultura BDA a uma concentração de 5 mg/mL⁻¹.

A mistura foi autoclavada a 120 ° C, durante 15 minutos e ao atingir temperatura ambiente foi vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. No centro de cada placa, foi adicionado um disco de micélio do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. de 0,5 cm de diâmetro com dez dias de crescimento. As placas foram incubadas em BOD a 27° C e submetidas a avaliação do diâmetro das colônias no sentido longitudinal e ortogonal, com auxílio de paquímetro digital, até que um dos tratamentos atingisse as bordas da placa. A avaliação crescimento micelial foi realizada conforme descrito no item **4.3**.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 X 3), sendo 5 espécies vegetais e 3 solventes, com cinco repetições, sendo cada unidade experimental uma placa de Petri. Como testemunha foram usadas placas contendo o meio de cultura BDA e o micélio de *Colletotrichum* sp. Adicionalmente foi realizado um controle com a adição de DMSO na placa contendo meio BDA e o micélio do fitopatógeno.

Imediatamente após o ensaio anterior, foram coletados os esporos das placas nas quais foi avaliado o crescimento micelial, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada às placas e com auxílio de um pincel de cerdas macias, os esporos foram liberados na solução, pipetou-se uma alíquota de 20 µl dessa solução e adicionou-se a lâminas de microscopia semi-permanentes em três gotas para quantificação dos conídios feita pelo método de contagem em gota.

A porcentagem de inibição da esporulação foi obtida pela fórmula: $PIE = [(esporulação\ da\ testemunha - esporulação\ do\ tratamento) / esporulação\ da\ testemunha] \times 100$ (FERNANDES et al, 2015).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e à partir de resultado significativo para o teste F aplicou-se o teste de médias as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa Assistat 7.7 Beta.

4.5. Avaliação do extrato bruto aquoso (EBA) de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* na severidade da antracnose em plantas de cebolinha

Foi avaliado o efeito do EBA das cinco espécies vegetais, na severidade da antracnose em plantas de cebolinha em casa de vegetação. O experimento foi realizado no Setor de Produção da Faculdade de Ciências Agrárias da Ufam.

Semeadura

Sementes de cebolinha da cultivar “Todo Ano” (NEBUKA) japonesa, foram adicionadas a bandejas de isopor próprias para semeadura com 128 células, em cada célula foi adicionado 2 sementes contendo o substrato comercial Vivatto slim plus®, constituído de casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica, as plântulas foram mantidas em casa de vegetação na área de produção da faculdade de ciências agrárias, onde foram monitoradas e receberam irrigação diariamente.

Transplante

Trinta dias após a semeadura, procedeu-se o desbaste e as melhores mudas foram transplantadas para copos de plásticos com capacidade para 500 mL. Antes do plantio foi realizada a análise de solo da amostra de terriço retirada para cultivo das plantas, a correção da acidez e adubação foi feita mediante resultado da análise. A mistura que compunha os copos descartáveis, foi composta de terriço, adicionado a 200 g/m² de calcário e 10 L/m² de cama de aviário. As plantas mantidas em casa de vegetação foram monitoradas e receberam irrigação diariamente.

Teste de patogenicidade

Quando as cebolinhas completaram dois meses de idade, suas folhas foram coletadas e levadas ao Laboratório de fitopatologia, onde foram lavadas e adicionadas a placas de Petri com 15 cm de diâmetro, previamente forradas com papel de filtro esterilizado.

Estas folhas foram submetidas a avaliações em dias alternados, até que surgisse a lesão da antracnose, para confirmação do teste de patogenicidade.

Aplicação por aspersão dos extratos vegetais e solução de inóculo

Quando as cebolinhas mantidas em casa de vegetação completaram três meses de idade e cinco folhas definitivas, receberam a aplicação foliar de 20 mL de (EBA) a uma concentração de 50% das espécies vegetais e após quarenta e oito horas, foram inoculadas por aspersão com solução de inóculo na concentração de 10^5 conídios/mL⁻¹, a solução foi preparada adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada em placas de Petri, em isolados de *Colletotrichum* sp. com 10 dias de crescimento.

Com auxílio de um pincel de cerdas macias, os conídios foram liberados na solução, que foi recolhida em béquer, onde foi adicionada uma gota de Tween 80 e agitada. A concentração de inóculo foi ajustada para 10^5 conídios/mL⁻¹ em câmara de Neubauer. As plantas foram inoculadas por aspersão, utilizando-se um aplicador manual e em seguida foram submetidas a câmara úmida durante 48 horas.

Avaliações dos níveis de severidade de cebolinhas com sintoma de antracnose

Ao término desse período, as cebolinhas foram submetidas a sete avaliações em dias alternados. Essas avaliações basearam-se na severidade da doença que foi quantificada, segundo a escala diagramática com cinco níveis de severidade 1%, 5%, 20%, 50% e 80%, descrita por Azevedo (1997). Com os dados de severidade foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de acordo com formula de Campbel e Maden (1992), onde:

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Sendo:

n = é o número de observações.

X_i = é a severidade da doença na “i”- ésima observação;

t_i = é o tempo em dias na “i”- ésima observação.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (cinco espécies vegetais) e cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de três plantas. A testemunha constou de plantas de cebolinha pulverizadas com solução de inóculo e água destilada esterilizada.

Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat versão 7.7 Beta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* sp.

Os isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de plantas de cebolinha apresentaram colônia com micélio de coloração branca a cinza. O centro das colônias apresentou coloração alaranjada devido a presença de mucilagem característica da produção de conídios do gênero *Colletotrichum*, com estruturas de coloração negra, representando acérvulos de onde surgiram os conídios hialinos, de formato falciforme, com um septo transversal medindo entre 15 a 20 μm de comprimento e 3,4 a 4,5 μm de largura, (Figura 1 A e B).

Os apressórios foram visualizados solitários e em grupos, de coloração marrom escuro, devido a presença de melanina, e formato lobado ou irregular, de modo geral, os apressórios foram oriundos de hifas, medindo de 15,7 a 38,01 μm de comprimento e 7,05 a 28,4 μm de largura (Figura 1 C).

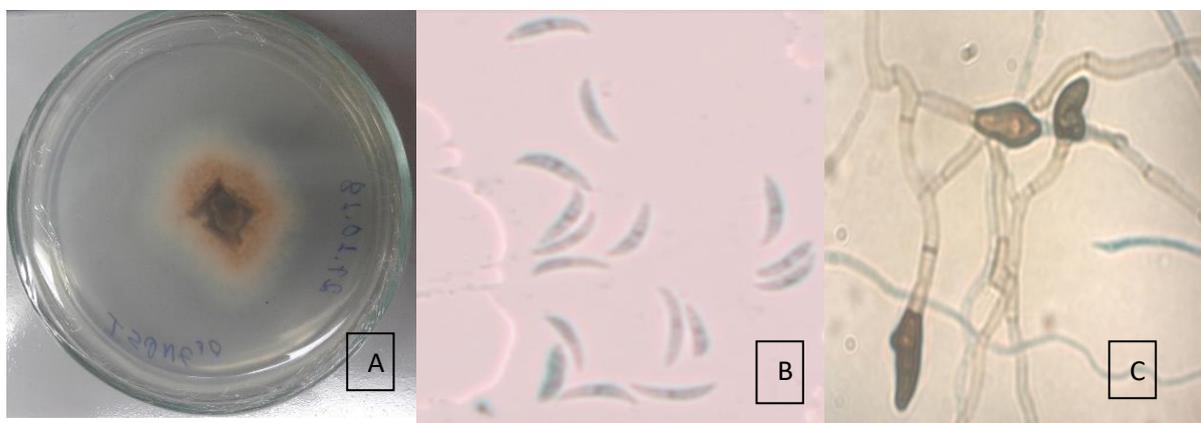


Figura 2. Aspecto morfológico de *Colletotrichum* sp. associado a antracnose em plantas de cebolinha. A) Colônia de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). B) Conídios de formato falciforme. C) Apressórios melanizados originados de hifas.

A identificação de espécies deste gênero é difícil devido à ampla variação das características morfológicas, sendo estas delimitadas usando-se poucos caracteres como tamanho e forma de conídios e apressórios e características das colônias, como textura e coloração. A grande plasticidade morfológica é um reflexo da grande variabilidade genética que ocorre neste gênero, além da forte influência do ambiente em alguns caracteres como a formação de setas e produção de conídios (Menezes 2002). Vale ressaltar que estudos relacionados com especificidade fisiológica em uma gama de plantas hospedeiras ainda são bastante importantes para a descrição das espécies (Sutton 1992; Bentes e Costa-Neto, 2011).

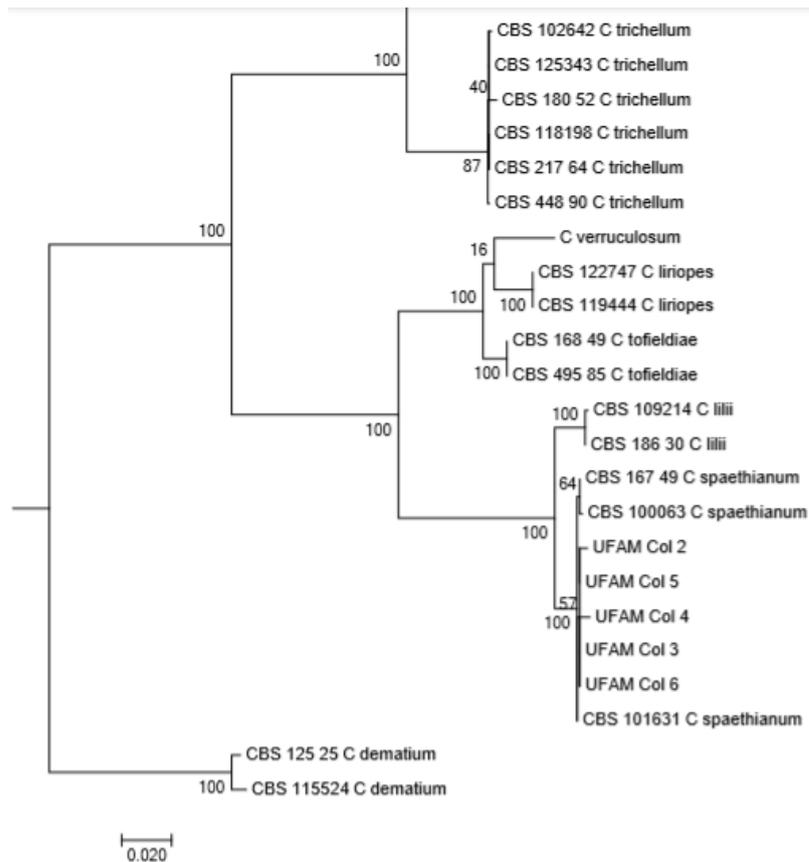


Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies de *Colletotrichum* construída da concatenação das regiões genômicas parciais do espaçador interno transcrito rDNA (ITS), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina(TUB2). Os valores de bootstrap são indicados na árvore. Isolados com o código UFAM foram usados no presente trabalho.

Fonte: A autora (2019).

Sequências parciais dos genes ITS, GAPDH e B-tubulina dos isolados UFAM Col 2, UFAM Col 5, UFAM Col 4, UFAM Col 3 e UFAM Col 6, revelaram identidade de 99 % para os três genes com sequências de *Colletotrichum spaethianum*.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A espécie foi identificada causando antracnose em cebolinha no Amazonas por Santana et al. (2016). No entanto Matos et al. (2017) relataram mais duas outras espécies, *C.truncatum* e *C.theobromicola* também associados a antracnose em cebolinha no estado, o que indica a ocorrência de um complexo de espécies nessa planta hospedeira.

5.2 Efeito dos (EBA) de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* no crescimento micelial e produção de conídios em isolados de *Colletotrichum spaethianum*.

A avaliação dos EBA no crescimento micelial revelou que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para os tratamentos com *Curcuma longa*, *Croton cajucara* e *Laportea aestuans*, nas diferentes concentrações avaliadas. Os EBA de *Piper marginatum* e *Picrolema sprucei*, apresentaram menor ICM nas concentrações de 40 e 50%, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Quanto a porcentagem de inibição de esporulação (PIE), a concentração de 10% apresentou menor PIE para todos os tratamentos, e na concentração de 50% foi observado a maior PIE, sendo que o EBA de *Croton cajucara* apresentou maior inibição da esporulação do fungo (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de crescimento micelial (ICM) e porcentagem de inibição de esporulação (PIE) de *Colletotrichum spaethianum* cultivado em meio contendo diferentes concentrações de extrato bruto aquoso de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans*

%	Espécie Vegetal									
	Caferana		Piper		Croton		Curcuma		Laportea	
	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE
0	3,59 a	0 d	2,22 a	0 f	2,40 a	0 f	3,17 a	0 d	3,10 a	0 c
10	2,96 b	15,10 c	2,60 a	7,53 e	2,19 a	30,98 e	2,92 a	11,17 c	2,75 a	20,34 b
20	2,85 b	30,93 b	2,43 a	15,86 a	2,17 a	43,46 d	2,65 a	18,65 b	2,58 a	31,17 a
30	3,06 b	30,98 b	2,85 a	27,19 c	2,39 a	74,44 c	2,69 a	27,74 b	3,03 a a	35,17 a
40	1,94 b	34,04 b	1,97 b	30,37 b	2,37 a	82,18 b	2,36 a	25,93 b	3,21 a	39,28 a
50	1,75 b	40,79 a	1,50 b	45,40 a	2,08 a	89,62 a	2,62 a	37,63 a	2,83 a	42,93 a
CV (%)	14,97	14,58	14,97	10,22	14,97	32,06	14,97	2,94	14,97	26,79

ICM dado em cm; PIE dado em %.

Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: A autora 2019.

A presença dos metabólitos secundários de *Piper marginatum* isosafrole e nathosmirnol podem ser os responsáveis pela inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum spaethianum* cultivado em meio contendo EBA a concentração de 50%. Pesquisas como a de Sanchez et al. 2011 determinaram a composição química do óleo essencial de *Piper marginatum* avaliaram a atividade e antifúngica contra *Alternaria solani*. Seu rendimento foi determinado e sua composição química foi investigada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O efeito antifúngico do seu óleo essencial foi determinado em *Alternaria solani*. O óleo essencial é constituído principalmente por compostos oxigenados com isosafrole e nathosmirnol como os principais componentes. O óleo apresentou efeito antifúngico contra *Alternaria solani corroboram com esses resultados*.

Chaves et al. 2018 avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas de *Piper marginatum*. O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa e sua atividade antifúngica foi analisada contra *R. oryzae*. Os principais componentes de *P. marginatum* foram propiopiperona (13,2%) e δ -3-careno (11,3%). A propiopiperona apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Pode-se afirmar que o óleo essencial de *Piper marginatum* apresenta ação fungistática significativa contra os esporos de *Rizopus oryzae*.

A presença de compostos bioativos quassinóides em *Picrolema sprucei* podem ser os responsáveis pela inibição da germinação dos conídios. Contudo, não existe pesquisa publicada com resultado significativo que comprove a ação fungistática de *Picrolema sprucei*. Sobre essa planta há apenas a revisão de Alves et al 2014 onde são enfatizadas as diversas atividades biológicas atribuídas pela medicina popular e por estudos científicos à planta amazônica *Picrolema sprucei* Hoof. F. Maior ênfase é dada aos conhecimentos atuais sobre os principais componentes químicos encontrados nessa espécie, da classe dos quassinóides: sergeolida, neosergeolida, isobruceína e 1,5-desacetil.

A presença de compostos bioativos no morfotipo branco de *Cróton cajucara* linalol ou 7- hidroxicalameneno do morfotipo vermelho podem ser os responsáveis pela inibição da germinação dos conídios. Essa atividade antimicrobiana de *Cróton cajucara* vem sendo elucidada em algumas pesquisas, como a de Azevedo et al. 2013 avaliaram a eficácia dos óleos essenciais em relação a atividade antimicrobiana contra microorganismos fitopatogênicos demonstrando significativas zonas de inibição. Entre os microorganismos testados, os óleos essenciais ricos em 7 – hidroxicalameneno foram mais eficazes contra

M. smegmatis, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus oryzae*, foi possível observar que os óleos ricos em 7-hidroxicalameneno apresentaram atividade antimicrobiana com CIM de 39,06 µg / mL para *M. smegmatis* e 0,152 µg / mL para *R. oryzae* e 3,63 x 10 µg / mL para *M. circinelloides*.

Chaves et al. 2012 investigaram a eficácia dos óleos de quarenta indivíduos de dois morfotipos de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), sacaca branca e sacaca vermelha. Os óleos essenciais das folhas desses morfotipos são ricos em linalol e 7-hidroxicalameneno. A eficácia dos óleos de quarenta indivíduos de um banco de germoplasma quanto a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foi investigado pelo método de difusão em ágar. Foram observadas zonas de inibição expressiva para ambos os microorganismos testados. Os óleos essenciais ricos em 7_hidroxicalameneno foram mais eficazes contra *Staphylococcus aureus*, enquanto os ricos em linalol atuaram inibindo *Candida albicans*.

A análise estatística do ensaio *in vitro* com EBA, difundidas em meio de cultura BDA, adicionado ao fitopatógeno *Colletotrichum spaethianum* revelou menor ICM para as espécies vegetais *Picrolema sprucei* e *Piper marginatum*.

Quanto a PIE, o maior valor foi observado com o EBA de *Croton cajucara*. Esses extratos vegetais proporcionaram ação fungistática sobre o fitopatógeno *Colletotrichum spaethianum in vitro*.

É possível que a inibição do crescimento micelial e inibição da germinação dos conídios tenha ocorrido devido a ação dos compostos bioativos quassinóides em *Picrolema sprucei*, metabólitos secundários de *Piper marginatum* e bioativos de *Croton cajucara*. Na fase *in vitro* do experimento com EBA das espécies vegetais avaliadas.

5.3 Efeito dos extratos fracionados de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* sobre o crescimento micelial e produção de conídios de *Colletotrichum spaethianum*.

A avaliação dos extratos fracionados no crescimento micelial revelou que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey 5%, para as frações de *Laportea aestuans*, *Croton cajucara* e *Piper marginatum*. A fração acetílica de *Curcuma longa* apresentou menor ICM, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2).

Quanto a (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação, a fração acetílica de *Laporthea aestuans* apresentou menor valor de (PIE) e a fração metanólica de *Picrolema sprucei* apresentou maior valor de (PIE).

Tabela 2. Índice de crescimento micelial (ICM) e porcentagem de inibição de esporulação (PIE) de *Colletotrichum spaethianum* cultivado em meio contendo frações hexânica, acetato etílica e metanólica de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans*.

Espécie	Concentração de Extrato Fracionado em meio de cultura BDA									
	BDA		BDA+DMSO		FHex + DMSO		FACeEt + DMSO		FMet + DMSO	
	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE	ICM	PIE
Caferana	3,59 a	0 d	2,96 b	0 d	3,92 b	69,67 b	3,64 c	48,23 d	5,24 a	97,99 a
Piper	2,22 a	0 d	2,60 a	0 d	4,36 b	37,87 d	4,92 b	75,29 b	6,05 a	51,17 c
Cróton	2,40 a	0 b	2,19 a	0 b	4,80 b	94,70 a	4,90 b	83,52 a	5,64 a	60,46 b
Curcuma	3,17 a	0 d	2,92 a	0 d	6,05 a	45,86 c	1,78 d	56,58 c	5,24 a	42,93 d
Urtiga	3,10 a	0 c	2,75 a	0 c	4,39 b	93,52 a	6,52 a	7,05 e	4,91 a	9,99 e
CV (%)	13,78	2,61	13,78	2,71	13,78	2,61	13,78	2,61	13,78	2,61

ICM dado em cm; PIE dado em %.

Valores seguidos da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: A autora 2019.

A ação fungistática do bioativo de *Curcuma longa* vem sendo elucidada em pesquisas como a de Teles et al. 2019 avaliaram a composição química, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Curcuma longa*. O principal composto do óleo essencial de *Curcuma longa* foi tumerona. A CIM demonstrou atividade antimicrobiana significativa do óleo essencial de *Curcuma longa* contra *Staphylococcus aureus* equivalente a $83,3 \pm 14,43 \mu\text{g} / \text{ml}$. O óleo essencial de *Curcuma longa* diminuiu a produção de nitrito em macrófagos peritoniais, mas não em células infectadas por *Leishmania*. A composição química do óleo essencial de *Curcuma longa* está diretamente associada a sua potencial ação biológica, como atividade antimicrobiana. *Curcuma longa* apresentou uma potente atividade antileishmania contra amastigotas, promastigotas e intracelulares de *Leishmania amazonenses*, embora essa atividade não esteja ligada ao óxido nítrico, já que o óleo essencial de *Curcuma longa* inibe sua produção.

Apesar de a fração hexânica de *Laportea aestuans* ter apresentado menor valor de PIE, seu composto bioativo salicilato de metila revelado no óleo essencial de *Laportea aestuans* em outra pesquisa comprovou ação fungistática. Essa ação antimicrobiana direta da Urtiga foi comprovada por Oloyede et al 2014 os autores extraíram o óleo essencial de *Laportea aestuans* a urtiga por hidrodestilação, o processo de extração revelou que seu óleo essencial é composto por bioativo salicilato de metila, seu óleo possui atividade antimicrobiana significativa, a qual pode ser comprovado por meio do ensaio *in vitro* do extrato bruto e das frações de todas as partes da planta *Laportea aestuans* (Gaud) realizado através do método de difusão em ágar contra 4 fungos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolon* e *Penicillium notatum*). Onde todos os extratos demonstraram efeito antimicrobiano de amplo espectro, quando comparados com tioconazol.

A presença de compostos bioativos quassinóides em *Picrolema sprucei* podem ser os responsáveis pela inibição da esporulação de *Colletotrichum spaethianum*, contudo, não existe pesquisa com resultado significativo que comprove a ação fungistática de *Picrolema sprucei*.

A análise estatística do ensaio *in vitro* com o extrato fracionado das 5 espécies vegetais, difundidas em meio de cultura BDA, adicionado ao fitopatógeno *Colletotrichum spaethianum* revelou menor ICM para a fração acetílica de *Curcuma longa*.

Quanto a PIE, o maior valor foi observado com a fração acetílica de *Laportea aestuans*. Essa fração proporcionou ação fungistática sobre o fitopatógeno *Colletotrichum spaethianum in vitro*.

É possível que a inibição do crescimento micelial e inibição da germinação dos conídios tenha ocorrido devido a ação dos compostos bioativos curcuminóides em *Curcuma longa* e quassinóides de *Picrolema sprucei*, das frações das duas espécies vegetais avaliadas.

5.4 Efeito dos extratos vegetais de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* na severidade da antracnose em plantas de cebolinhas.

A avaliação da severidade da antracnose em plantas de cebolinha tratadas com os (EBA) Extrato Bruto Aquoso revelou que não houve diferença estatística significativa em plantas tratadas com os extratos vegetais em estudo, no entanto, plantas tratadas com extrato de *Piper marginatum* apresentaram menor severidade da doença e (AACPD) área abaixo da curva de progresso da doença, seguido das plantas tratadas com o extrato vegetal de *Picrolema sprucei*. Nos tratamentos com *Curcuma longa* e *Croton cajucara* foi observado o aumento da intensidade da doença, em comparação com a testemunha (Tabela 3).

É possível que a ação antifúngica proporcionada pela aplicação foliar do extrato vegetal de *Piper marginatum* seja atribuída aos metabólitos secundários presentes na espécie vegetal (Azevedo et al. 2014), pois estes metabólitos secundários ativam a rota metabólica das plantas hospedeiras, ativando todos os seus mecanismos de defesa, inclusive as fitoalexinas (AGRIOS et al. 2005).

Gurjar et al. 2012 complementa esses estudos de estratégias alternativas de controle para reduzir a dependência a fungicida sintético, através das plantas com capacidade de sintetizar metabólitos secundários como fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonóis, taninos e cumarinas. Os componentes com estrutura fenólica, como cavacrol, eugenol e timol são altamente ativos contra o patógeno. Estes grupos de compostos possuem efeito antimicrobiano e atuam como mecanismo de defesa das plantas contra microorganismos, como indutores de resistência.

Sobre espécies do gênero *Piper* há relatos na literatura, sobre compostos identificados e comprovados como antimicrobianos. Assim como o trabalho realizado por Araújo et al 2014, avaliaram o efeito dos extratos de *Piper marginatum* contra o fitopatógeno *Colletotrichum scovilei* do pimentão, como o extrato metanólico de *Piper marginatum* foi o mais ativo, ele foi submetido ao fracionamento biomonitorado, a fração a concentração de 1,5 ppm inibiu o crescimento micelial de *C. scovilei* de forma mais eficiente que o fungicida mancozeb.

Quanto a ação antifúngica da caferana, ainda não há trabalho que comprove essa ação, no entanto Clark (1937) isolou os primeiros quassinóides e os identificou como quassina e neoquassina. Já para Curcino Vieira e Braz-Filho, 2006 a espécie *Picrolema sprucei*, conhecida popularmente pelo nome de caferana, é pertencente a simarubaceae, essa família possui como característica ser fonte de moléculas bioativas, consideradas fontes promissoras de pesquisa.

Tabela 3. Severidade da antracnose (*Colletotrichum spaethianum*) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de cebolinha (*Allium fistulosum*) tratadas com extrato bruto aquoso de *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans*

Espécie vegetal	Severidade da antracnose (%)*	AACPD
Picrolema	43,0a	154,0a
Piper	38,5a	134,6a
Croton	66,0a	230,1a
Curcuma	69,0a	241,5a
Laportea	47,0a	195,0a
Testemunha	53,0a	185,5a

*dados são a média de dois experimentos. Para Níveis de Severidade cv = 41,07 %. Para AACPD cv = 39,44 %.

Fonte: A autora 2019.

O nível de severidade das plantas tratadas com (EBA) de *Croton cajucara* foi mais elevado que o controle, essa elevação no nível de severidade é explicada com a pesquisa realizada por Araújo et al. 2013 investigaram a possível variação dos constituintes químicos de óleos essenciais de folhas de *Croton heliotropiifolius* e avaliaram sua atividade antibacteriana. Seu óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa. Os microorganismos utilizados foram *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus aureus*. Colheita de 250 g de folhas foi realizada pela manhã, variando de três meses de acordo com as estações do ano verão, outono, inverno e primavera.

Os constituintes químicos identificados foram os mesmos em todas as amostras. O β -cariofileno é o principal constituinte em todas as amostras e sua porcentagem foi equivalente

a 46,99% no inverno, 43,85% na primavera, 41,04% no verão e 28,61% no outono, seguido de bicyclogermacrene, germacreno-D, limoneno e 1,8-cineole. Sesquiterpenos estavam em maiores proporções em todas as amostras. A explicação mais provável para haver β -cariofileno em maiores proporções no óleo essencial, no período de maiores temperaturas, é que esse composto é um sesquiterpeno e sua perda para o meio ambiente ocorre de forma mais natural que os monoterpenos, que são compostos com menor peso molecular e evapora mais rapidamente. Seguindo um raciocínio semelhante, o monoterpeno 1,8-cineol foi encontrado em maior proporção durante o outono 16,31%, exatamente a estação em que o β -cariofileno estava em menor proporção.

As plantas tratadas com (EBA) de *Curcuma longa* também apresentaram maior nível de severidade que as plantas controle. Essa alteração é explicada pelo fato de que a espécie *Curcuma longa* é insolúvel em água (CHANG e CHEN, 2015), sendo assim, podemos afirmar que a água não é o solvente mais indicado para extrair o bioativo predominante na espécie vegetal.

A presença de compostos bioativos em *Curcuma longa* como os curcuninóides: tumerona, atlantona e zingiberona, podem ser os responsáveis pela inibição da germinação dos conídios. Algumas observações foram feitas por Gupta et al 2015 quando testaram extrato aquoso e frações obtidas a partir de Éter de petróleo, benzeno, clorofórmio e metanol do rizoma de *Curcuma longa* contra *S. aureus*. Onde foram feitos testes de suscetibilidade antimicrobiana das diferentes frações do rizoma de *Curcuma longa* contra *S.aureus* e mostraram que todas as frações do rizoma de *C. longa* são eficientes contra isolados de *S. aureus*, mostrando faixas de inibição entre 9 e 21 mm. Puderam constatar que as diferentes frações foram agentes antimicrobianos mais eficazes que o extrato bruto de *Curcuma longa*.

De modo geral, os extratos vegetais produzem metabólitos secundários, responsáveis por ativar a rota metabólica das hospedeiras, ativando todos os seus mecanismos de defesa, inclusive as fitoalexinas.

Na revisão de Surprata 2016, o autor afirma que o uso de extratos vegetais como agentes de biocontrole através de plantas superiores de origem tropical podem produzir substâncias antimicrobianas diversas. Substâncias como flavonoides alcaloides e terpenóides são os metabólitos secundários produzidos pelas plantas com ação de defesa química contra doenças. O autor cita diversos exemplos, dentre eles a aplicação de extratos de folhas de *Piper betle* e extrato de raiz da *Alpinia galanga* contra *Fusarium oxysporum* e *Pseudomonas solanacearum* no campo, controlou significativamente a doença da murcha da bananeira, o

extrato de folhas de *Piper caninum* reduziu significativamente a intensidade da doença do arroz, ocasionada por *Pyricularia oryzae* em condições de campo.

Danila et al. 2014 os extratos vegetais inibiram significativamente a porcentagem da podridão do inhame branco ocasionada por *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium oxalicum*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum in vivo*. A análise fitoquímica dos extratos da casca de *Oryza sativa* e *Quercus phillyraeoides* revelaram a presença de alguns metabólitos secundários alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos, ácido ferúlico, flobataninas, terpenóides, fenóis, antraquinona e ácido pirolenhoso.

As espécies vegetais *Picrolema sprucei*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara*, *Curcuma longa* e *Laportea aestuans* devem ser utilizadas como fungicidas naturais no manejo da antracnose (*Colletotrichum spaethianum*) em cebolinha (*Allium fistulosum*), seus compostos bioativos e metabólitos secundários possuem potencial de ação fungistática, a qual foi comprovada através dos ensaios *in vitro* desta pesquisa. Quanto a sua ação no controle da doença *in vivo*, os metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, quando aplicados em hospedeiras, ativam todos os mecanismos de defesa pós-formados, proporcionando menor nível de severidade da doença antracnose.

6. CONCLUSÕES

Os extratos brutos aquosos de *Piper marginatum*, *Picrolema sprucei* e *Croton cajucara* apresentaram efeito inibidor significativo do crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum spaethianum in vitro* indicando potencial para o manejo da doença.

A fração acetílica de *Curcuma longa* apresentou menor ICM, já a fração metanólica de *Picrolema sprucei* apresentou maior valor de PIE no ensaio *in vitro* com extratos fracionados, indicando a presença de moléculas com potencial para o controle de *Colletotrichum spaethianum* nesta fração vegetal.

No controle *in vivo* da antracnose da cebolinha, os extratos brutos aquosos de *Piper marginatum* e *Picrolema sprucei* reduziram a severidade da doença, apresentando menor AACPD, podendo ser estes extratos uma alternativa ecológica para o manejo da doença em campo.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. Métodos em fitopatologia. Fungos fitopatogênicos. Viçosa, MG: **Editora da UFV**, cap.2. p 62-64. 2016.
- ALMEIDA, L.P. Departamento de alimentos/ALIM-UNI-BH. **Ciência agrotecnológica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 875-881, maio/jun., 2008.
- AMARAL, D.R., et al. Instituto Federal do Triângulo Mineiro - **Campus Uberaba, MG**, Brasil, 2018.
- ANDRADE, B.S. ; MATIAS, R. ; CORREA, B.O. ; OLIVEIRA, A.K.M. ; Guidolin, D.G.F. ; Roel, A.R. **Brazilian Journal of Biology**, 2018, Vol.78(1), p.140(7).
- ARAÚJO, E. R. et al. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fungos de Solos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/no, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil, **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.49, n.2, p.88-94, fev. 2014.
- AZEVEDO, M. M. B.; PEREIRA, A. Q.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D.S. **Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of *Croton cajucara* Benth.** J. Essent. Oil Res, v. 24, p. 351–357, 2012.
- AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ALMEIDA, C. A. ; BIZZO, H. R.; DUARTE, R. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. **Molecules** (Basel, Switzerland), 16 January 2013, v.18(1), p.1128-37. 2013.
- AZEVEDO, M.; ALMEIDA, C.; CHAVES, F.; CAMPOS-TAKAKI, G.; ROZENTAL, S.; BIZZO, H.; ALVIANO, C.; ALVIANO, D.. **Planta Medica**, 2014, v.80 (07), p.550-556.
- ALMEIDA, M. M. B., ARRIAGA, A. M. C., SANTOS, A. K. L., LEMOS, T. L. G., BRAZ-FILHO, R., VIEIRA, I. J. C. **Ocorrência e atividade biológica de quassinoides da última década.** Quim. Nova 30, 935-951, 2007.
- ARRIAGA, A. M. C., MESQUITA, A. C., POULIQUEN, Y. B. M., LIMA, R. A., CAVALCANTE, S. H., CARVALHO, M. G., SIQUEIRA, J. A., ALEGRIO, L. V., BRAZ-FILHO, R. **Chemical constituents of *Simarouba versicolor*.** An. Acad. Bras. Cienc. 74, 415-424, 2002.
- ARIYANTI, N. A.; HOA, V. Q.; LUDMILA, I.; KHRUSTALEVA, S. H.; Production and characterization of alien chromosome addition lines in *Allium fistulosum* carrying extra chromosomes of *Allium roylei* using molecular and cytogenetic analyses. **Springer Science Business Media Dordrecht**, 2015.
- BAILEY, J. A e JEGER, M. J. *Colletotrichum*: biology, **pathology and control**. Kew. CAB International. 1992.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Food Science and Technology**, Chichester, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.

BENTES, J.L.S.; Costa neto, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* Alberq. Usando marcadores AFLP. **Acta Amazônica**. Vol.41 (2 2011): 251 – 256.

BIGATON, D.; BACCHI, L, M, A.; FORMAGIO, A. S. N.; WALBER LUIZ GAVASSONI, W. L.; E ZANELLA, C. S.; Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757-763, outubro, 2013.

BRADFORD, M. M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 2012.

BRÚ, J. GUZMAN, J.D. Departamento de Química y Biología, División de Ciencias Básicas, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 26, p. 767–779.2016.

CARDOSO, M. O.; BERNI, R. F. Índices agronômicos na cebolinha com doses de sulfato de amônio. **Horticultura Brasileira**, 30:2375-2382, 2012.

CANNON, P. F.; DAMM, U; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213, 2012.

CARRÉ, V.; STANGARLIN, J. R.; BECKER, A.; ZANELLA, A. L.; GONÇALVES JR., A. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G.; CRUZ, M. E. S. Controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana (*Musa* sp.) por cânfora (*Artemisia camphorata*) e quitosana. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2006.

CARNEIRO, S. M. de T. P. G.; PIGNONI, E.; GOMES, J. C. Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle da mancha-angular do feijoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 6-10, 2008.

CASTELANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n.3, p.225-226, May 1939.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 532 p, 1990.

CHANG, TSAN-CHANG ; JANG, HUNG-DER ; LIN, WANG-De ; DUAN, PENG-FU. **Food Chemistry**, 1 January 2016, v.190, p.724-729.

CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ANGELO, P. M. C.; XAVIER, J.J. B. N.; SÁ-SOBRINHO, A. F. Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de Folha de Dois Morfotipos de Sacaca (*Croton cajucara* Benth.). **Revista brasileira de plantas mediciniais**, v. 8, p. 117–119, 2006.

CHUAKUL W. Medicinal plants in khao kho district, phetchabun province, Thailand. **Pharm Biol** v. 38: p. 61-67.2000.

CHATTOPADHYAY I, KAUSHIK B, UDAY B, RANAJIT KB. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Curr Sci** 2004;87:44-53.

CHANG H. B.; e CHEN B. H.; Inhibition of lung cancer cells A549 and H460 by curcuminoid extracts and nanoemulsions prepared from *Curcuma longa* Linnaeus. **Int J Nanomed.** v. 10:p. 5059–5080, 2015.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de *Momordicacharantia*L. sobre *Colletotrichum musae*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.337-341, 2011.

CAVIÃO, H. C. et al. Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, **Laboratório de Controle de Doenças de Plantas**, 95070-560. Caxias do Sul, RS, Brasil, 2018.

COUTRI, M. L. Aspectos gerais da Olericultura no Estado do Amazonas. Manaus: **EMBRAPA-UEPAE de Manaus**, 28 p, 1988.

CLARK, EP, 1937. Quassin I. A preparação e purificação de quassina e neoquassin, com informação acerca das suas fórmulas moleculares. **Chem. Soe**, v. 59, p. 927-931.

CURCINO VIEIRA, I. J., BRAZ-FILHO, R. Quassinoids: structural diversity, biological activity and synthetic studies. **Stud. Nat. Prod. Chem.** v. 33, p. 433-492, 2006.

DANIA et al . This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, **provided the original work is properly credited**, 2014.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO; A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v.13, p.414430, 2012.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**.v. 39: p. 45-87, 2009.

DAMAS, M. F. F. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* l. no desenvolvimento micelial do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & sacc. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 2, n. 1, p. 66-81, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Manual técnico de Olericultura**. Rio de Janeiro, Brasília, 98 p. (Manuais, 28). 1980.

EL-MASSRY, K. F.et al. Chemical compositions and antioxidant/ antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

FARAZUDDINM,DUAB,ZIAQ,KHANAA,JOSHIBANDOWAISM,Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals. **Int J Nanomed** 9:1139–1152, 2014.

FERNANDO, E. S., QUINN, C. J. Pericarp anatomy and systematics of the simaroubaceae sensu lato. **Aust. J. Bot.** 40, 263-289, 1990.

FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P. **Nutrição e adubação de hortaliças.** In: ANAIS DO SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E ADUBAÇÃO DE HORTALIÇAS, Jaboticabal, 1990. *Anais...* Piracicaba: POTAFOS, p.473 - 476, 1993.

FERREIRA, F. E. P; CASIMIRO, M. I. E. C. **O cultivo da cebolinha gerando renda na Agricultura Familiar de Juazeiro.** 3º Encontro Universitário da UFC no Cariri. 2011. Disponível em: <<http://encontros.cariri.ufc.br/index.php/eu/eu2011/paper/viewFile/.../417>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

FERREIRA, E. F. et al. uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 346-352, Junho 2014.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 402 p, 2000.

GANIYAT K. OLOYEDE e OLUKOYEJO E. AYANBADEJO, 2014. Triagem fitoquímica, tóxica, antimicrobiana e antio *Laportea aestuans* (Gaud). **Journal of Medical Sciences**, v. 14: p. 51-59. 2014.

GABRIELA SILVA MOURA ET AL. Potencial de extratos etanólicos de propólis e extratos aquosos de plantas espontâneas no controle de doenças pós-colheita do morango. **Revista Verde** - ISSN 1981-8203 - (Pombal - PB) v. 11, n.5, p.57-63, Edição especial, 2016.

Gen Bank, localizado no site NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) via ferramenta Blast (nucleotideblast).

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63-68, 2006.

GUNDIDZA, M. et al. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 7164-7169, 2009.

GUPTA, A. et al. Department of Microbiology, School of Life Sciences, Dr. B.R. **Ambedkar University**, Agra, India, 2015.

HADDAD, F.; MAFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de fungicidas para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cebola. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, 2003.

HALFELD-VIEIRA, B.A; Nechet, Kátia de Lima **Acta Amazônica**, January 2008, v. 38(3), p.583-584.2

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

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; NUNES, D. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. **Phytomedicine**, 9, 523–529, 2002.

HYDE, K. D.; ABD-ELSALAM, K. C. L. Morphology: still essential in a molecular world. **Mycotaxon** 114:439-451, 2010.

HOUËL, E., BERTANI, S., BOURDY, G., DEHARO, E., JULLIAN, V., VALENTIN, A., CHEVALLEY, S., STIEN, D. Quassinoid constituents of Quassia amara I. Leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity. **J. Ethnopharmacol.** 126, 114-118, 2009.

IDAM, 2017. (www.idam.gov.br). Acesso em: 15/01/2019.

JIANG, X. M., ZHOU, Y. Canthin-6-one alkaloids from *Picrasma quassioides* and their cytotoxic activity. **J. Asian. Nat. Prod. Res.** v. 10, p. 1009-1012, 2008.

JOHNNY, L.; YUSUF, U.K.; NULIT, R. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: Phyllachorales). **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.4157-4165, 2011.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60 (6):p. 969-976, 1970.

KAFEEL, H. RUKH, R. QAMAR, H. “Possibility of drugdrug interaction in prescription dispensed by community and hospital pharmac,” **Pharmacology e Pharmacy**, vol. 9, 2017.

KEEN, N.T.; HOLLIDAY, M.L.; YOSHIKAWA, M. Effects of glyphosate on glyceollin production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n.11, p.1467-1470, 1982.

LIU, F. et al. Mechanism of biological control to anthracnoses in mango by antimicrobial cinnamaldehyde. **JFruitSci** v. 28:p. 651–656 (2011).

MATOS, K. S.; HANADA, R. E.; SILVA, G. F.; SOUSA, N. R. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Allium fistulosum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, p. PDIS-07-15-0737, 2017.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

MONFARED, M., A. KAMKAR, S. GHAFARI-KHALIGH, A. JEBELLI- JAVAN, F. ASADI & A. AKHUNDZADEH-BASTI. Antioxidative effects of Iranian *Urtica dioica* L. extracts on the oxidation of sunflower oil. **J. Med. Plants.** v. 5:p. 4438-4445, 2011.

MOURA, G.S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.*; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá-UEM, Av. Colombo, 5790, CEP 87.020-200, Maringá-PR. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.309-315, 2014.

MURAI M, YOSHINO A, JITSUKAWA S, UCHIDA T. Studies on the tillering factors of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.). **Bull Chiba Found Seed Stock Farm** v. 3:p. 21–42, 1981.

MUHAMMAD, I., BEDIR, E., KHAN, S.I., TEKWANI, B.L., KHAN, I.A., TAKAMATSU, S., PELLETIER, J., WALKER, L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **J. Nat. Prod.** v. 62, p. 772-777, 2004.

MUNSELL, C. C. History of the Munsell Color System Dorothy Nickerson for. **The Munsell Color Foundation**, Inc. 1975.

MANORANJAN KAR, M.; MISHRA, D.; Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase **Activities during Rice Leaf Senescence.**, 1975.

NIERO, R. Dissertação de Mestrado, **UFSC, Florianópolis**, SC 1993.

OLOYEDE, et al 2013 isolaram os compostos bioativos da fração n-hexânica de *Laportea aestuans*.

OLOYEDE, GANIYA K. **Arabian Journal of Chemistry**, September 2016, Vol.9, pp.S840-S845. 2016.

PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; RODRIGUES, M.; MORAIS, E.K.L.; MACIEL, M.A.M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognósia**. V. 17, p. 521–528, 2007.

PEREIRA, C. S.; MAIA, L. F. P.; PAULA, F. S. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, v.61, n.1, 2014.

PEREIRA, J.E.S. Dieta de três espécies Simpátricas de Felídeos em Floresta Ombrófila Mista e Campos Gerais, Paraná, Sul do Brasil **U. F.P. Curitiba**, 2009.

PINEDA M., R.; VIZCAÍNO P., S.; GARCÍA P., C.M.; GIL G., J.H.; DURANGO R., D.L. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, p.507-515, 2012.

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v. 29, n. 8, p. 838-842, 2010.

POURMORAD, F., S.J. HOSSEINIMEHR e N. SHAHABIMAJD. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African J. Biotechnol.** v. 5: p. 1142-1145, 2006.

POTTER PE, Curcumin: a natural substance with potential efficacy in Alzheimer's disease. **J Exp Pharmacol** v. 5: p. 23–31, 2013.

REIGADA, J.B.; TCACENCO, C.M.; ANDRADE, L.H.; KATO, M.J.; PORTO, A.L.M.; LAGO, J.H.G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal

activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.1054-1058, 2007.

RAHMAN, A.; AL-REZA, S.M.; KANG, S.C. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.88, p.573-579, 2011.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. DOENÇAS DO MAMOEIRO. IN: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, São Paulo. v.2. p. 261-297, 1997.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. DOENÇAS DO MAMOEIRO. IN: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, São Paulo. v.2. p. 261-297, 1997.

REIS, A.; MADEIRA, N.R. Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no Estado do Amazonas. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009.

REIS, A.J. et al; **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 01 October 2016, Vol.1(1), pp.108-124.

R. J. Z. NEGREIROS et al. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-‘prata’ com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 1, p. 051-058, Março 2013.

ROSA, M.S.C.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial activity of linalool-rich essential oil from *Croton cajucara* Benth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 1895–1901. **Molecules**. v. 18 p. 1136. 2013.

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

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

SALGADO, F. H. M.; Silva, J.; Oliveira, T. C.; Barros, H. B.; Passos, N. G.; Fidelis, R. R.; Comportamento de genótipos de feijão, no período da entressafra, no sul do Estado de Tocantins. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 52-58, 2011.

SÁNCHEZ, YAÍMA ; CORREA, TERESA M ; ABREU, YUDITH ; MARTÍNEZ ; DUARTE, YANISIA; Pino, Oriela. **Revista de Protección Vegetal**, 01 December 2011, Vol.26(3), pp.170-176.

SANTANA, K. F. A.; GARCIA, C. B.; MATOS, K. S.; HANADA, R. E.; SILVA, G. F.; SOUSA, N. R. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Allium fistulosum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, p. PDIS-07-15-0737, 2016.

SANTOS, R.H.S. et al. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.11, p.1395-1398, 2001.

SANTOS, L. L.; SEABRA JUNIOR, S.; NUNES, M. C. M. Luminosidade, temperatura do ar e do solo em ambientes de cultivo protegido. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 8, n. 1, p. 83-93, dez. 2010.

SAKLANI, S. & S. CHANDRA. In vitro antimicrobial activity nutritional profile of medicinal plant of Garhwal, Himalaya. **Int. J. Pharm. Sci. Res.** 3: 268-272, 2012.

SARAIVA, R.C.G., BARRETO, A.S., SIANI, A.C., FERREIRA, J.L.P., ARAÚJO, R.B., NUNOMURA, S.M., POHLIT, A.M. Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). **Acta Amaz.** 33, 213-220, 2002.

SILVA, A. C. da. et al. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1853 - 1860, 2009.

SILVA, K. S. S. et al. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SILVA, M.A.B., MELO, L.V.L., RIBEIRO, R.V., SOUZA, J.P.M., LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T.O., SILVA, R.M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognósia**. 20, 549-562, 2010.

SILVA et al 2012. Utilização do extrato aquoso de cinamomo no controle da antracnose da videira. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 312-318, 2012.

SILVA, K. D. P. da; DALLACORT, R.; SANTI, A.; FARIA JUNIOR, C. A.; SOUZA, K. A. de; BARBIERI, J. D. Cultivo de alface submetidos a diferentes ambientes de cultivo e coberturas de solo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, n. 1, p. 20-23, jun. 2015.

SILVA, D. F.; ARAÚJO NETO, S. E.; FERREIRA, R. L. F.; RIBEIRO, S. A. L.; SILVA¹, R. S.; SILVA, N. M. Controle alternativo da antracnose em cebolinha orgânica cultivada em ambiente protegido e campo. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Patos-PB, v.13, n.3, p.223-228, 2017.

SILVA, F.A.S. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 03 de abril de 2017. Disponível em. <http://www.assistat.com/> Acessado em: 10 de abril de 2017.

SIMÃO, S.M., BARREIROS, E.L., SILVA, M.F.G.F., GOTTLIEB, O.R. Chemo geographical evolution of quassinoids in Simaroubaceae. **Phytochemistry** 30, 853-865, 1991.

SOUZA, P.A. et al. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.754-757, 2005.

SOUZA, B. P. de; SIMÕES, A. C.; ALVES, G. K. E. B.; FERREIRA, R. L. F.; ARAÚJO NETO, S. E. de. Produtividade e rentabilidade de cebolinha orgânica sob diferentes densidades de plantio e métodos de colheita. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1576-1585, maio/jun. 2015.

SOUZA, P. G. et al. **Summa Phytopathologica**, 01 June 2017, Vol.43(2), pp.158-160.

SALUNKHE, V.N.; ANANDHAN, N.S.; GAWANDE, S.J.; IKKAR, R.B.; First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Mouse Garlic (*Allium angulosum*). publicado 08/03/2015.

SUN, Q.N.; NAJVAR, L.K.; BOCANEGRA, R.; LOEBENBERG, D.; GRAYBILL, J.R. In vivo activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 2310–2312, 2002.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: **Centre for Agriculture and Biosciences International**, p. 1-26, 1992.

SURPRAPTA, D.N.; SUDARMA, M.; ARYA, N.; OHSAWA, K. Plant extracts to control wilt disease in banana seedlings. **J. ISSAAS**, v. 11: p. 84-90. 2005

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 54-56, 2003.

TRIACA, T. Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, **Laboratório de Controle de Doenças de Plantas**. Caxias do Sul, RS, Brasil.2018.

TSUKAZAKI H, YAMASHITA K, YAGUCHI S, YAMASHITA K, HAGIHARA T, SHIGYO M, KOJIMA A, WAKO T QTL analysis for pseudotempungency in bunching onion (*Allium fistulosum*). **Mol Breed**. v. 30: p. 1689–1698, 2012.

TOURNAS, V. H.; KATSOUZAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 11–17, 2005.

VIEIRA, W. A. S.; MICHEREFF, S. J. First Report of Anthracnose caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Hemerocallis flava* in Brasil. **Plant disease**. v.98, n.7, p.997, 2008.

VU, K. D.; HOLLINGSWORTH, R. G.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 1, p. 198–203, 2011.

WEAVER, L.M.; HERRMANN, K.M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in Plant Science**, London, v.2, n.9, p.346-351, 1997.

WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L.F. **Manejo Fitossanitário na Cultura da Cebola**. Florianópolis: Epagri, p.226, 2006.

YAMAZAKI H.; SHIRAIWA N.; ITAI A.; HONDA I. Involvement of gibberellins in the regulation of tillering in Welsh onion (*Allium fistulosum* L.). **Hortic J** 84:334–341, 2015.

ZÁRATE.H.N.A.; VIEIRA, M.C; WEISMANN, M.; LOURENÇÃO, A.L.F. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.574-577, 2003.

ZÁRATE.H.N.A.; VIEIRA, M.C; GRACIANO, J.D. Produção de cebolinha, solteira e consorciada com rúcula, com e sem cobertura do solo com cama-de-frango. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 505-514, out./dez. 2006.

ANEXOS

Anexo 1 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Picrolema sprucei*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	1124,49642	82,5564**
Resíduo	24	13,62095	
Total	29		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade

Anexo 2 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Croton cajucara*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	882,59798	21,1338**
Resíduo	24	41,76245	
Total	29		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade

Anexo 3 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Curcuma longa*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	6036,36673	2436,7733**
Resíduo	24	2,47720	
Total	29		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade

Anexo 4 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Piper marginatum*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	1370,58362	295,5611**
Resíduo	24	4,63723	
Total	29		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade

Anexo 5 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Laportea aestuans*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	1254,43777	22,0503**
Resíduo	24	56,88974	
Total	29		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade

Anexo 6 – Resumo da análise de variância para a variável (ICM) Índice de Crescimento Micelial do ensaio *in vitro* com (EBA) Extrato Bruto Aquoso de *Picrolema sprucei*, *Curcuma longa*, *Piper marginatum*, *Croton cajucara* e *Laportea aestuans*.

FV	GL	QM	F
Tratamento	29	1,11988	7,5097**
Resíduo	120	0,14913	
Total	149		

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 7 – Resumo da análise de variância para a variável (PIE) Porcentagem de Inibição da Esporulação de *Colletotrichum spaethianum* nas frações hexânicas, acetate-etílicas e metanólicas de *Picrolema sprucei*, *Curcuma longa*, *Croton cajucara*, *Piper marginatum* e *Laportea aestuans*.

FV	GL	QM	F
Espécies vegetais	4	4529,52414	1959,9726**
Solventes	2	1892,66756	818,9771**
Espécies x Solventes	8	4213,70530	1823,3145**
Tratamentos	14	3972,36243	1718,8829**
Resíduo	60	2,31101	-
Total	74	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 8 – Resumo da análise de variância para a variável (ICM) Índice de Crescimento Micelial de *Colletotrichum spaethianum* nas frações hexânicas, acetate-etílicas e metanólicas de *Picrolema sprucei*, *Curcuma longa*, *Croton cajucara*, *Piper marginatum* e *Laportea aestuans*.

FV	GL	QM	F
Espécies vegetais	4	4,12719	9,4872**
Solventes	2	5,77240	13,2690**
Espécies x Solventes	8	8,13044	18,6894**
Tratamentos	14	6,64979	15,2859**
Resíduo	60	0,43503	-
Total	74	-	-

**significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Anexo 9 – Resumo da análise de variância para a variável Nível de Severidade do ensaio *in vivo* com (EBA).

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	766,62720	1,6282ns
Resíduo	24	470,85067	
Total	29		

Ns não significativo.

Anexo 10 – Resumo da análise de variância para a variável (AACPD) Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença do ensaio *in vivo* com (EBA).

FV	GL	QM	F
Tratamento	5	8666,44068	1,5411ns
Resíduo	24	5623,44037	
Total	29		

Ns não significativo.

Anexo 11 – Resultado da análise de solo para instalação do experimento em casa de vegetação.

Análise química	
pH –Acidez ativa (CaCl ₂)	6,5
H + Al-Acidez potencial(SMP) (cmolc dm ⁻³)	1,3
P- Fósforo (Mehlich-1) (mgdm ⁻³)	200
K – Potássio (cmolc dm ⁻³)	266
Al – Alumínio (KCl) (mgdm ⁻³)	0
Ca – Cálcio (mgdm ⁻³)	6,6
Mg – Magnésio (mgdm ⁻³)	1,3
MO – Matéria orgânica (colorimetria) (dag Kg ⁻¹)	2,4
t – Cap. de troca de cátions efetiva (cmolc dm) (mgdm ⁻³)	8,58
T – Cap. de troca de cátions a pH 7 (mgdm ⁻³)	9,88
SB – Soma de bases (mgdm ⁻³)	8,58
V – Saturação por bases (%)	86,84
m – saturação por alumínio (%)	0

Análise de solo realizada no Laboratório de solos da Ufam.